



Thèse de Doctorat

Mention Biologie Santé, Spécialité Physiologie Intégrée

Présentée à

L'Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

Par

Ghada ELMHIRI

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

Effets des produits de glycation des formules laitières sur la programmation développementale : focus sur le stress oxydant du porcelet RCIU

Soutenue le 26 Octobre 2015, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M^{me} Véronique Bach	Professeur Université Jules Vernes Amiens	Président
M. Umerto Simeoni	Professeur, Services de Pédiatrie-DMCP Lausanne	Rapporteur
M. Mustapha Rouis	Professeur, Université Pierre et Marie Curie Paris IV	Rapporteur
M^{me} Eline M. van der Beek	Professeur, Directrice de recherche à Danone Singapour	Examineur
M^{me} Latifa Abdennebi-Najar	Professeur Institut polytechnique LaSalle Beauvais	Directeur de thèse
M. Frédéric Tessier	Professeur Institut polytechnique LaSalle Beauvais	Co-directeur

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

A mes très chers parents

A la mémoire de ma grand-mère

A ma grand-mère Aychoucha

**A mes sœurs, frères, mes nièces
et mes neveux**

**A ma chère directrice de thèse
Latifa**

**A mes chères amies Narges et
Fatma**

Remerciements

Et voilà, ça y est ! Ces années de thèse sont passées et cette aventure se termine.

Une thèse, c'est bien sûr avant tout un long travail scientifique, mais c'est aussi une expérience forte et enrichissante. C'est également un travail de prime abord personnel, mais qui pourtant ne saurait être réalisé seul. C'est ainsi que je souhaite ici remercier toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidée à mener à bien ce projet. Il est difficile d'exprimer par des mots tous ces sentiments, mais je vais tenter de le faire, en essayant de n'oublier personne.

Je tiens à remercier Mr. Philippe Choquet, directeur général de l'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, Madame Valérie Leroux Directrice délégué, Mr. Thierry Aussenac, directeur scientifique, et Madame Véronique Lorens, directrice des ressources Humaines et financières pour m'avoir accueillie au sein de l'institut laSalle et pour le financement de ma thèse.

*Je tiens avant tout à remercier Mme le Professeur **Rouis Mustapha** et Mr le Professeur **Umberto Simeoni** qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail. J'exprime ma gratitude à Mme le Pr **Véronique Bach**, qui a accepté d'être Président de jury et à Mme **Eline M. van der Beek**, Directrice de recherche à Danone, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Tout particulièrement, j'exprime mes remerciements au Pr **Rouis Mustapha** de m'avoir accueilli dans son Laboratoire pour effectuer mon stage de Master 2 Recherche qui m'a permis de poursuivre en Doctorat. Vous avez su m'initier et me donner les armes pour démarrer dans la vie scientifique et dans le monde de la recherche. C'est un honneur pour moi que vous soyez dans ce jury de c thèse et d'évaluer mon travail.*

Mes remerciements s'adressent évidemment à Latifa et Fred sans qui rien n'aurait été possible. Merci d'avoir toujours su vous montrer présents, de m'avoir laissé ma liberté tout en guidant mes choix et d'avoir toujours su avoir confiance en moi. Je sors de cette thèse grandie et enrichie par votre confiance et votre amitié.

Particulièrement,

A Latifa, ma directrice de thèse

J'ai vraiment de la chance de t'avoir dans ma vie ! Je te remercie de m'avoir toujours dis ce dont j'avais besoin d'entendre au lieu de ce que je voudrais bien entendre, et de

m'apprendre une autre façon de voir les choses. Merci de m'avoir ouvert ma réflexion au monde passionnant de la programmation ...

Je te remercie de ton ouverture d'esprit...de m'avoir fait confiance. Je te remercie d'avoir été toujours honnête avec moi et pour ta tendresse... d'être là pour moi. Je te remercie d'être mon amie de si nombreuses et importantes façons. Je te remercie d'avoir mis tant d'effort, de tendresse et d'imagination dans notre relation amicale et professionnelle, de partager tant de si bons moments et de créer tant de si bons souvenirs avec moi. Je n'oublierai jamais nos voyage à New York, Singapour et surtout Tokyo (Pas-Mo, le parapluie orange, péage à Philadelphie et Brooklyn Bridge à NY), nos fous rires partagés aux pauses café, les allers-retours Beauvais/ Creil-Chantilly... Je n'oublierai pas non plus ces journées et soirées d'Août où on finissait la rédaction et correction de la thèse... Un énorme merci à ta petite famille (Mous, Isma et Mimi) qui m'a beaucoup soutenu pendant le période de rédaction. Je vous aime !

Merci de toujours avoir été disponible et de m'avoir épaulé dans les moments de doutes et dans les péripéties qui ont rythmé ma thèse. Merci de m'avoir soutenu jusqu'au bout et particulièrement dans la dernière ligne droite où ta rigueur n'a jamais failli. La rédaction de ce manuscrit n'aurait jamais pu être achevée SANS toi. J'ose croire que tu n'as pas besoin de lire ces quelques lignes pour savoir la profonde gratitude que je te témoigne et les nombreuses qualités qui ont fait de toi une directrice exceptionnelle.

Je sors de cette thèse grandie et enrichie par ta confiance et ton amitié.

Tu es une « grande » personne, mêlant qualités humaines, scientifiques qui forcent mon admiration. Je t'aime !

A mon co-directeur de thèse Frédéric Tessier

Merci pour ta disponibilité, ton écoute, tes conseils, ta rigueur et ta passion pour le monde des Maillard et la chimie analytique particulièrement. Ce fut un plaisir de travailler avec toi.

A ma sœur, collègue et amie Narges

Merci pour ton soutien, ton encouragement, ta patience et ta sympathie durant toutes ces années de thèse. Merci pour le temps consacré à relire et corriger ma thèse. Merci surtout pour la promotion de Word, que Bill et Melinda Gates t'en soient reconnaissant et te finance tes futures recherches sur la programmation. Je n'oublierai jamais notre voyage à Singapour et surtout le parapluie orange... nos fous rires partagés aux pauses café me marqueront à jamais. « Narjoussa » ton humilité et ton savoir-faire ont été deux moteurs clés dans mon envie de grandir dans ce métier. A cela s'ajoute l'amitié qui est née très rapidement entre nous. Tu m'as tellement appris tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Un grand Merci aussi à ta petite famille (Mehdi, Naylo, Lythoun, Fatouma et Yasmino) qui m'a beaucoup soutenue pendant le période de rédaction. Je vous aime !

A Stéphane,

Je te remercie pour ton aide et tes conseils. Merci pour ton encouragement et ta bonne humeur, particulièrement durant les derniers mois de thèse. Merci de l'œil curieux et intéressé que tu as toujours eu sur mes travaux; merci de ton savoir en matière de toxicologie.

Sache que j'ai pris beaucoup de plaisir à interagir avec toi et que ta sympathie et ta passion sont deux éléments qui ont, sans nul doute, apportés un agrément supplémentaire à cette thèse.

A Dler,

Tu es pour moi un grand frère. Merci pour ton aide continue, merci pour ces cinq années d'amitié et de fraternité depuis mon master. Je garde de toi l'image d'un homme humble et travailleur d'une gentillesse sans égale.

A Céline, Anne Laure, Aurore et David,

Merci pour votre accompagnement et toute l'aide technique et le soutien morale que vous m'avez apportés tout au long de cette thèse.

A l'équipe du Pr Halima Ouadid-Ahidouch que j'ai eu le plaisir de côtoyer, et particulièrement à **Mathieu** merci pour ta contribution à l'avancée de mon étude.

*Merci au Pr Friguet Bertrand et Pr Rouis Mustapha pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe lors de notre collaboration au cours de ma thèse. J'aimerai donc remercier Martin, Marie-Paule, Khadija, Vimala pour leurs aides et leur gentillesse. Et particulièrement, ma chère **Dominique**. Là encore je reprendrai le terme non-officiel de « Maman du labo » qui t'a toujours été octroyé par mes prédécesseurs, merci d'avoir été aussi prévenante et attentionnée. Du fond du cœur je te remercie pour ta présence, ton aide « même à distance », ton amour et de m'avoir appris et partager tes compétences et ton savoir-faire. Merci beaucoup pour le temps passer à relire ma thèse. Je t'aime !*

*Aux personnes avec qui j'ai pu interagir à l'**INRA**, vous vous reconnaissez... merci à vous !*

*Un spéciale Merci à **Samir** et **Julie**, les futurs docteurs Merci pour l'enrichissement scientifique que votre contact a pu m'apporter mais aussi et peut-être même surtout, pour les instants de détente et de « déconne » qui ont rendu cette thèse d'autant plus fun. Je vous souhaite le meilleur et toute la réussite possible. Nos manips et la vie du labo vont beaucoup me manquer ...*

A Laure et Naouel mes collègues et voisines. Merci pour le petit bout de chemin que nous avons parcouru ensemble. Vous allez me manquer ...

Plus particulièrement, Naouel ! Un grand merci pour ton aide précieuse surtout dans la dernière ligne droite. Je n'oublierai jamais les soirées passées dans le bureau, les pizzas délicieuses et nos fous rire....ces souvenirs seront gravés à jamais dans ma mémoire !

A ma sœur, collègue et amie Fatma

Un immense merci à toi ma « fatouma » d'avoir été là pour moi, de m'avoir écouté, épaulé et encouragé. Merci pour ton amitié sans faille, ton soutien et tes conseils. Je n'oublierai jamais les repas si délicieux partagés et nos fous rires pendant les pauses café. Merci à ton époux Noomen pour son encouragement infini et sa bonne humeur.

*Quelle piètre étudiante aurai-je été si je n'avais pas été formée par un enseignant digne de ce nom. Un grand merci à vous **Mounir Madhioub**. Votre enseignement fut très formateur.*

A Khaled Haj-Taieb, un grand merci du fond du cœur pour ton encouragement, tes conseils et ton soutien continu.

*Parce que sans eux la vie ne serait rien ... **Emna, Mouna, Olfa, Afef, Dounia, Karima et Maria** Merci pour votre amitié sans faille, votre oreille attentive, votre présence, votre soutien et vos conseils. Avec vous seront désormais attachés les souvenirs de nos grandes discussions et de bons moments de fun. Je vous aime !*

Je tiens à remercier Judith, Anandhi, et Marie les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer au cours de cette thèse. C'était un véritable plaisir de travailler avec vous. J'ai beaucoup appris au cours de ces expériences. J'espère que vous en garderez d'aussi bons souvenirs que moi !

A Véronique, Hélène, Laetitia, Laila et Larbi

Merci pour les pizzas party partagés, pour votre sympathie et votre bonne humeur durant ces années de thèse.

*A **Aziza**, merci pour ton sourire toujours omniprésent et ton implication dans mes manips. Je te souhaite le meilleur et toute la réussite possible.*

A Lyes et Lamia

Un grand merci du fond du cœur pour votre aide, votre bonne humeur et votre sympathie surtout pendant les derniers mois de thèse. Merci Lamia pour le temps consacré à relire mon document et pour ton encouragement infini.

*Je tiens également à remercier le personnel de LaSalle Beauvais que j'ai croisé durant ces années de thèse et en particulier **Mélanie, Christine, Daniel et Thierry**...*

A mes deux sœurs Nawel, Donia, et mon beau-frère Lazhar

Avec toute ma tendresse et toute mon affection, merci d'avoir été là pour moi, de m'avoir écouté et soutenu depuis mon enfance. J'espère que vous trouverez dans cette modeste thèse l'expression profonde de mon amour.

A mes chers parents

En témoignage de mon profond respect, mon grand amour et toute ma gratitude, pour tous les sacrifices que vous avez consentis, je vous dédis cette modeste thèse.

Vous m'avez donné toute l'attention et tout l'amour qu'un être puisse espérer. Vos conseils, et votre amour m'ont toujours accompagné et ont éclairé mon chemin.

*Je vous AIME ! **Nul mot ne peut exprimer ma profonde gratitude.***

Enfin, du plus profond de mon cœur, je remercie tous ceux que je ne pourrai pas citer, mais pour qui m'ont accompagné jusqu'à ce jour mémorable.

Résumé:

La programmation des maladies non transmissibles est désormais un paradigme établi. Les événements indésirables encourus au cours de la vie fœtale peuvent affecter le développement du fœtus et sa santé future. Ce risque de pathologies à l'âge adulte est majoré lorsqu'il est associé à un environnement défavorable. Plusieurs arguments scientifiques viennent étayer le rôle des contaminants alimentaires dans les processus de la programmation développementale. Parmi ces contaminants, aucune mention n'est faite aux produits de la glycation issus des traitements thermiques des aliments et dont l'implication dans les désordres métaboliques et rénaux et dans le vieillissement est largement connue. Afin de vérifier leur implication dans la programmation du stress oxydant et de l'inflammation, nous avons administré à des porcs RCIU deux formules laitières. Une formule fortement chauffée à 120°C pendant 10 minutes (HHF) et une formule faiblement chauffée à 37°C pendant 5 minutes (LHF). Nous avons montré que la consommation de la formule HHF induit : **1)** l'augmentation de la CML libre dans le sang des porcelets nourris avec ce régime ; **2)** la présence d'un marquage de la CML dans les noyaux des cellules épithéliales rénales. Cette présence a également été observée dans les reins des animaux nourris avec le régime LHF mais pas chez les porcs allaités ; **3)** une activation du récepteur soluble RAGE et l'augmentation de l'expression de gènes du système rénine-angiotensine, de l'inflammation, de l'apoptose ainsi que de l'oxydation des protéines dans le rein et dans le foie ; **4)** des modifications importantes dans l'expression et le niveau d'activité de certaines enzymes anti-oxydantes dans le foie et le rein. Ces effets à long terme de la consommation postnatale de la formule HHF témoignent incontestablement d'un phénomène de programmation du système oxydant et de l'inflammation. Au niveau du colon, la formule HHF a contribué à l'augmentation transitoire des Bifidobactéries et des bactéries lactiques et à l'activation d'enzymes anti-oxydantes, démontrant le rôle joué par le microbiote intestinal dans la défense contre la présence des AGEs alimentaires pro-oxydants. Des études impliquant le MG dans les processus de programmation fœtale ont été initiées sur le modèle rongeur. Elles montrent que le MG module la sécrétion d'insuline pancréatique de la descendance à l'âge adulte. Au regard de ces résultats, ce travail apporte des preuves nouvelles sur l'implication des AGEs alimentaires dans les processus de programmation développementale et souligne l'importance du contrôle de la présence de ces composés dans l'alimentation de la mère et de l'enfant.

Mots-clés : Programmation développementale, formule infantile, RCIU, microbiote, AGEs, CML, porcelets, stress oxydant

Abstract

Programming of non-communicable diseases is now a well-established paradigm. Adverse events occurring during fetal life can affect fetal development and future health. This risk of disease in adulthood is increased in unfavorable environments. Several scientific studies support the role of dietary contaminants in developmental programming. Among these contaminants, no mention is made of glycation end products generated by heat treatment, which are largely implicated in metabolic disorders, kidney disorders and aging. In order to test their possible involvement in the programming of oxidative stress and inflammation, we administered two dairy formulas to IUGR pigs. First, a formula heated at 120 °C for 10 minutes (High Heated Formula: HHF), followed by a formula heated at 37 °C for 5 minutes (Low Heated Formula: LHF). We showed that the consumption of HHF formula did the following: **1)** induced an increase in the level of free CML in the blood of IUGR animals during artificial suckling. **2)** Resulted in the labelling of CML in the nuclei of renal epithelial cells. This labelling has also been detected in kidneys of animals fed with the LHF formula, but not in the kidneys of natural suckling piglets. **3)** Activation of the soluble RAGE receptor, an increase in gene expression of the renin-angiotensin system, and an increase in inflammation, apoptosis and protein oxidation in the kidney and liver. **4)** Significant changes in the expression and activity levels of certain antioxidant enzymes in the liver and kidney. These long-term effects of postnatal consumption of HHF formula undoubtedly demonstrate a programming phenomenon of oxidative stress and inflammation. In the colon, the HHF formula contributed to the transient increase in bifidobacteria and lactobacilli, and the activation of antioxidant enzymes, demonstrating the role of the gut microbiota in the defense against the presence of dietary pro-oxidant AGEs. Studies involving the Methylglyoxal the fetal programming process were initiated in the rodent model. They show that the MG modulates the secretion of pancreatic insulin by progeny during adulthood. In view of these results, this work provides new evidence for the involvement of dietary AGEs in the developmental programming process, and underlines the importance of controlling the presence of these compounds in the diet of both the mother and child.

Keywords: Developmental programming, infant formula, IUGR, microbiota, AGEs, CML, piglets, oxidative stress.

Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture

Articles originaux publiés

G. Elmhiri, L.F.Barella, D.Vieau, S. Camous, P. C. F. Mathias and L. Abdennebi Najjar. Acute exposure to a precursor of advanced glycation end products induces a dual effect on the pancreatic islets function. **Inter J Endocrinol.** 2014; 2014: 378284. doi : 10.1155/2014/378284.

Elmhiri G, Mahmood DF, Niquet-Leridon C, Jacolot P, Firmin S, Guigand L, Tessier FJ, Larcher T, Abdennebi-Najar L. Formula-derived advanced glycation end products are involved in the development of long-term inflammation and oxidative stress in kidney of IUGR piglets. **Mol Nutr Food Res.** 2015 Jan 31. doi: 10.1002/mnfr.201400722.

Malta A, de Oliveira JC, Ribeiro TA, Tófolo LP, Barella LF, Prates KV, Miranda RA, **Elmhiri G**, Franco CC, Agostinho AR, Trombini AB, Pavanello A, Gravena C, Abdennebi-Najar L, Mathias PC. Low-protein diet in adult male rats has long-term effects on metabolism. **J Endocrinol.** 2014 Apr 22;221(2):285-95. doi: 10.1530/JOE-13-0473.

Article soumis

Elmhiri G, Dou S, Hamoudi D, Firmin S, Reygnier J, Larcher T, Bahi-Jaber N and Abdennebi-Najar L. Probiotic effects and antioxidant capacities of formula derived AGEs in colon of IUGR juvenile pigs. Soumis dans **Journal of Free Radical Biology and Medicine** Sept 2015.

Revue de synthèse

G. Elmhiri, P. C. F. Mathias, J.C.Oliveira, C.Delayre-Orthez, L.F.Barella, L.P. Tofolo, G.S Fabricio, Chango A and Latifa ABDENNEBI-NAJAR. Maternal diet, bioactives molecules and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. **Eur J Nutr.** 2014 Apr;53(3):711-22

Communications orales

Effet du traitement thermique du lait sur la programmation du stress oxydant et de l'inflammation chez les porcelets RCIU. **Journée des Jeunes Chercheurs SFR CAP-Santé Reims Mars 2015.**

Long term modification of microbiota and antioxydant defenses in colon by high formula derived AGEs in IUGR individuals. **12th International Symposium on the Maillard Reaction September 1-4 2015, Tokyo, JAPAN**

Effet des produits de glycation sur la programmation développementale. **Concours ma thèse en 180 seconde. UPJV-Amiens, 17 Avril 2015.**

Communications affichées

G. Elmhiri, L.F.Barella, Mahmood DF, S. Camous, P. C. F. Mathias and L. Abdennebi Najar, 2013. Acute effect of Advanced Glycation end Products in insulin secretion process. The 2nd International Congress of Nutritional Science and Therapy » Philadelphia (USA) juillet 2013.

G. Elmhiri, Larcher T., Leridon-Niquet C., Jacolot P., Bahi-Jaber N., Boukthir S., Chango A., Tessier F.J. and Abdennebi-Najar L, 2013. Formula milk AGEs enhances kidney programming in IUGR piglets. 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, Singapour November 2013.

G. Elmhiri, L.F.Barella, Mahmood DF, S. Camous, P. C. F. Mathias and L. Abdennebi Najar, 2013. Acute dual effects of methyglyoxal on the secretion of insulin in isolated rat pancreas cells: implication for programming of the metabolism. 8th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, Singapour November 2013.

G. Elmhiri, D. Mahmood, C. Leridon, P. Jacolot, S. Firmin, S. Boukthir, F. Tessier, L. Tibaut and Latifa. Najar. AGE derived Formula Milk enhances Kidney programming proinflammatory process in the kidney of IUGR piglets. Journée des Jeunes Chercheurs SFR CAP-Santé Amiens, Mars 2014.

G. Elmhiri, D. Mahmood, C. Leridon, P. Jacolot, S. Firmin, F. Tessier, L. Tibaut and Latifa. Najar. Formula Milk is involved in programming of oxidative stress and inflammation in kidney of IUGR piglets. SF-DOHaD Nantes Novembre 2014.

Fabricio G.S., Firmin S., Bahi-jaber N., **Elmhiri G.**, Mathias P., Abdennebi-najar L. Cytotoxic effect of low doses of a maternal food contaminants mixture on pancreatic cells . Congres national de la Sf-Dohad. 6-7 Novembre 2014 Nantes, France

Reygnier J., Lichtenberger L., Dou S., **Elmhiri G.**, Delanaud S., Gay-Queheillard J., Bahi-Jaber N., Depeint F., Bach V., Khorsi-Cauet H., and Abdennebi-Najar, L.

Consequences of perinatal exposure to a pesticide, alone or combined with a prebiotic: effects on energy metabolism and microbiota composition. J DOHAD. J DOHAD. Volume, Supplement , November. Cambridge University Press. 7-8 November 2014, Nantes, France

Elmhiri G; Mahmood Dler F; Niquet-Leridon C; Jacolot P, Firmin S; Guigand L; Tessier F; Larcher T; Abdennebi-Najar L. Formula milk derived CML induces rage activation, long term inflammation and oxidative stress in IUGR piglets. 12th International Symposium on the Maillard, September 1-4, 2015, Reaction Tokyo, JAPAN.

Elmhiri G; Mahmood Dler F; Niquet-Leridon C; Jacolot P, Firmin S; Guigand L; Tessier F; Larcher T; Abdennebi-Najar L. Formula milk derived CML induces rage activation, long term inflammation and oxidative stress in IUGR piglets. DOHAD 2015. 9th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, South Africa, Cape Town, 8 - 11 November 2015.

S FIRMIN, **G ELMHIRI**, N BAHI-JABER, L ABDENNEBI-NAJAR. Effect of formula derived Advanced Glycation End products on liver antioxidant systems of IUGR piglets.. 9th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, South Africa, Cape Town, 8 - 11 November 2015.

S Firmin, A Malta, **G ELMHIRI**, N BAHI-JABER, L ABDENNEBI-NAJAR. Assessment of the effect of low doses of food contaminants on Min6 and rat isolated pancreatic cells stress response. DOHAD 2015. 9th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, South Africa, Cape Town, 8 - 11 November 2015.

Prix de la meilleure communication par poster

Prix de la meilleur communication par poster au 2nd International Conference and Exhibition on Nutritional Sciences & Therapy, July 15-17, 2013 Philadelphia Downtown, USA.

Prix de de la meilleur communication par poster au 12th International Symposium on the Maillard, September 1-4, 2015, Reaction Tokyo, JAPAN.

Abréviations

AGE : Produit avancé de la glycation (Advanced Glycation Endproduct)

AGPI : Acides Gras Polyinsaturés

AND: Acide désoxyribonucléique

AT1 (AGTR1) : Angiotensin II receptor type 1 (Récepteur de type 1 de l'angiotensine II)

ApoE : Apolipoprotéine E

ARN: Acide Ribonucléique

BSA : Bovin Serum Albumin

CEL : N^e-carboxyéthyllysine

CML : N^c-Carboxylméthyllysine

CpG : Cytosine Phosphate Guanine

CAT : Catalase

Cu/Zn SOD : Superoxide Dismutase (Cu-Zn)

CE-SSCP : Capillary Electrophoresis single-strand conformation polymorphism

DT1 : Diabète Type 1

DT2 : Diabète Type 2

FI: Formule infantile

GPx : Glutathion Peroxydase

GSH : Glutathion (GSH son état réduit)

GR : Glucocorticoïd Receptor

HEK293 : Human Embryonic Kidney 293 cells

HHF : High Heated Formula

HOMA : HomeOstasis Model Assesement

HMGB1 : High-mobility group Box 1

iNOS : Inducible nitric oxide synthase

IL : Interleukine

Ig : Immunoglobulin

IPGTT : Intrapéritoneal glucose tolerance

IUGR : IntraUterine Growth Restriction

IMC : Indice de Masse Corporelle

LDL : Low Density Lipoprotein

LHF : Low Heated Formula

LPS : LipopolySaccharide

MnSOD : Manganese-dependent SuperOxide Dismutase

MG : Méthylglyoxale

MDA : MalondiAldehyde

MRP: Maillard Reaction Product

NF-kB : Nuclear Factor-kappa B

NDPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

OMS : Organisation Mondiale de Santé

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économiques

PND : Postnatal day

PEPCK : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pdx1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha

UPLC-MS/MS : Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer

ROS (ERO) : Reactive Oxygen Species (Espèces Réactives Oxygénés)

RCIU : Retard de croissance intra-utérin

RAGE : Receptor of Advanced Glycation End products

sRAGE : soluble Receptor of AGEs

siRNA : small interfering RNA

SOD : Superoxide Dismutase

TFF3 : Trefoil factor 3

TNF α : Tumor Necrosis Factor

WHO : World Health Organization

Table des matières

PARTIE I: Synthèse Bibliographique.....	25
CHAPITRE I: Conditionnement de la santé à long terme.....	26
I.1 La programmation développementale	26
I.1.1 Origine du concept de la programmation développementale	26
I.1.2 Les mécanismes épigénétiques de la programmation développementale	28
I.1.3 Le retard de croissance intra-utérin.....	30
I.1.4 La programmation développementale des maladies chez le RCIU	38
I.2 Importance de la nutrition post-natale précoce : la lactation.....	52
I.2.1 Allaitement maternel.....	52
I.2.2 Allaitement artificiel : Définition et composition des formules infantiles	55
CHAPITRE II: Les produits de glycation avancée.....	67
II.1 Formation des produits de glycation avancée.....	67
II.1.1 Découverte et notions générales.....	67
II.1.4 Les AGEs dans les formules infantiles	73
II.2 Le récepteur des AGEs: le RAGE	74
II.3 Effets physiopathologiques des AGEs.....	77
II.3.1 Induction du stress oxydant et de l'inflammation par les AGEs.....	77
II.3.2 Modulation du microbiote intestinal par les AGEs alimentaires.....	78
II.3.3 Implication des AGEs endogènes et exogènes dans les complications des	79
pathologiques	79
i. Importance des AGEs alimentaires dans les complications liées au diabète	82
82	
ii. Rôle du système AGEs/RAGE dans les complications du diabète.....	83

PARTIE II: Objectifs	87
Partie III : Résultats	91
CHAPITRE III: Impact des AGEs des formules sur la programmation développementale du stress oxydant et de l'inflammation au niveau du rein chez le porc RCIU: Article 1	92
III.1 Introduction.....	93
III.2 Résultats marquants	95
III.3 Conclusion	97
III.4 Travaux complémentaires.....	99
III.4.1 L'alimentation des animaux, mesures pondérales et évaluation de la prise alimentaire	99
III.4.2 Evolution du poids et du gain de poids des animaux au cours de la croissance	100
III.4.3 Impact des AGEs des formules sur la programmation développementale du stress oxydant hépatique chez le Porc RCIU	104
III.4.4 Travaux complémentaires In vitro	109
i) <i>Culture cellulaire</i>	110
ii) <i>Transfection des HEK 293 : Utilisation des « petits ARN interférents » (siRNA)</i> 111	111
CHAPITRE IV: Effet des AGEs des formules sur la programmation du stress oxydant et de l'inflammation au niveau colique: focus sur l'implication du microbiote intestinal : Article 2	123
IV.1 Introduction.....	124
IV.2 Résultats marquants	125
IV.3 Retour sur la méthode CE-SSCP	126
IV.4 Résultats complémentaires:.....	129
IV.4.1 Evolution des populations bactériennes avec l'âge	129
CHAPITRE V: Effets des AGEs sur le dysfonctionnement de la cellule pancréatique : Article 3	133

V.1	Introduction.....	134
V.2	Résultats marquants	136
V.3	Travaux complémentaires.....	138
	V.3.1 Effets de l'exposition au MG de la mère sur la modulation de la sécrétion de l'insuline de la cellule pancréatique chez la descendance	138
	PARTIE IV: Discussion	145
	PARTIE V: Conclusion Générale	158
	PARTIE VI: Références bibliographiques.....	162
	PARTIE VII: Annexe.....	212

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Phases critiques de développement de la programmation. Adapté d'après (Fowden et al, 2006).....	27
Figure 2: Mécanisme de la régulation épigénétique: L'expression génique est activée ou réprimée par les groupements méthyles dépendants, qu'ils soient fixés ou non sur l'ADN. L'enroulement de l'ADN est modifié par les groupements acétyles qui, en interagissant avec les histones, modulent par conséquent l'activité génique.	30
Figure 3: Courbe de croissance fœtale et infantile (modifiée à partir de Fenton, 2003)	31
Figure 4 : La répartition géographique de la prévalence du RCIU dans les pays en développement (de Onis et al, 1998).....	32
Figure 5 : Les principales causes et conséquences de la programmation intra-utérine. D'après (Fowden & Forhead, 2004; Fowden et al, 2006).....	33
Figure 6 : principales causes de mortalité.....	39
Figure 7 : Les fonctions majeures du microbiote intestinal (Prakash et al, 2011).....	45
Figure 8 : Effets des facteurs externes sur le microbiote intestinal de l'enfant. Les flèches vertes montrent les modifications bénéfiques ; flèches rouges montrent les modifications comme négatives pour un développement sain.....	47
Figure 9 : Microflore intestinale de l'enfant : évolution en fonction de l'âge (Adapté de (Arrieta et al, 2014	48
Figure 10: Principaux systèmes prooxydants et anti-oxydants (Daum-Badouard, 2004).....	50
Figure 11 :Taux d'allaitement maternel selon la base de données de l'ODEC (OCDE, 2011).....	53
Figure 12 : Composition bactérienne des fèces humaines chez des nourrissons âgés de 4 semaines en fonction de la nature du lait (A) les nourrissons allaités, (B) nourrissons nourris au lait maternisé (Lee et al, 2015b).	64
Figure 13 : les grandes étapes de la formation des AGEs d'après (Ames, 1999; Hodge, 1953; Martins, 2003):.....	68
Figure 14 : Structure chimique de la CML.....	69
Figure 15 : Absorption, distribution et élimination des AGEs (Thornalley & Rabbani, 2014))	72
Figure 16 : La réaction de Maillard dans le lait (Pischetsrieder & Henle, 2012)	73

Figure 17 : La teneur en CML dans différents laits (Delatour et al, 2009)	74
Figure 18 : Description schématique du RAGE, récepteur aux AGEs, et de ses différents domaines (Schmidt et al, 2001)	76
Figure 19: Les différents ligands du RAGE (Leclerc et al, 2009)	77
Figure 20 : Schéma simplifié du mécanisme d'action cellulaire du complexe AGE-RAGE	78
Figure 21 : Comparatif de deux modèles de diabète (T1 et T2) : la réduction des AGEs alimentaires protège la structure des îlots chez des souris atteintes de diabète T1 (A) et de diabète T2 (B.)	83
Figure 22 Chronologie du développement de différents organes selon les espèces (Homme, porc, brebis, rongeurs.) Adapté d'après (Fowden et al, 2006).....	95
Figure 23 Courbe de la consommation moyenne de lait pendant la phase d'allaitement chez les deux groupes d'animaux LHF et HHF (n=15)	101
Figure 24: Evolution du gain moyen quotidien des animaux pendant les différentes phases d'expérimentation. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM. (** P< 0,01 Groupe LHF vs Groupe HHF). J = Age des animaux en jours. (n=15).....	102
Figure 25: Evolution du poids des animaux pendant les différentes phases d'expérimentation. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. (** P < 0,001 Groupe LHF vs Groupe HHF). J = Age des animaux en jours. (n=15).....	103
Figure 26 : Analyse de l'expression (A) et de l'activité (B) des enzymes antioxydantes hépatiques, la Superoxyde dismutase (SOD) et la glutathione peroxidase (GPx) chez les porcelets RCIU nourris aux formules faiblement chauffées LHF (\square) ou fortement chauffées HHF (\blacksquare). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, *: P<0.05 **: P<0.001, HHF (n=8), LHF (n=8).....	108
Figure 27 : Carbonylation des protéines totales au niveau du foie chez les porcelets RCIU - LHF (\square) et HHF (\blacksquare). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; HHF (n=5) et LHF (n=5).....	109
Figure 28 : Photographie de la lignée cellulaire HEK293. (Source : site www.atcc.org)	111
Figure 29 : Représentation schématique du mécanisme d'action d'un siRNA	112
Figure 30 : Principe du test de viabilité cellulaire MTT.....	114
Figure 31 : Cinétique de la transfection des HEK 293 : Les cellules ont été incubées avec le siRAGE (2 μ g) pendant 24, 48, et 72H à 37°C.....	118

Figure 32 : Effet de la CML sur la viabilité des cellules HEK :. Les cellules transfectées (siC et siRAGE) et ont été incubées pendant 48h à 37°C, en présence ou en absence de la CML (5 µg/mL). Le test MTT montre qu'en bloquant le RAGE, aucun effet significatif de la CML sur la prolifération cellulaire n'est observé. Dans les conditions contrôles, on note une augmentation de la la viabilité cellulaire avec la CML. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± S.E.M. (** P < 0,001 Groupe LHF vs Groupe HHF).....	119
Figure 33 : Effet des extraits de la formule fortement chauffée (HHF) (A) et faiblement chauffée (LHF) (B) sur la viabilité des cellules HEK 293.. Les cellules transfectées (siC et siRAGE) ont été incubées pendant 48h à 37° C en présence ou en absence des filtrats des formules (LHF et HHF) dont les concentrations de de la CML sont de 1.2 µg/mL et 0.3 µg/mL, respectivement).. Les résultats obtenus par qPCR montrent qu'après 48H d'incubation, les filtrats LHF et HHF augmentent la viabilité cellulaire, ; celle-ci se trouve fortement inhibée en absence du RAGE. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± S.E.M. (***P < 0,0001 ; ** P < 0,001 Groupe LHF vs Groupe HHF.) (n=8).....	120
Figure 34 : La CE-SCCP (<i>Capillary electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism</i>)	127
Figure 35 : Exemple d'une analyse d'un profil CE-SSCP d'après (Michelland , 2009)	128
Figure 36: Répartition des différents phyla bactériens aux 2 stades PND36 et PND 54	130
Figure 37 : Dendogramme représentant la classification hiérarchique selon le traitement thermique du lait et de l'âge	132
Figure 38 : Isolement des îlots de Langerhans chez le rat.	136
Figure 39 : Schéma récapitulatif du double effet modulateur du MG sur la sécrétion d'insuline au sein de par la cellule β pancréatique chez le rat adulte.....	137
Figure 40 : Schéma du protocole expérimental	139
Figure 41 : Mesure du poids à la naissance de la descendance des groupes C, RA et MG. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; C (n= 8), RA (n=8) et MG (n=8). *: P<0.05	142
Figure 42 : Trajectoire de la croissance de la descendance des groupes C, RA et MG. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; C (n= 8), RA (n=8) et MG (n=8).	143
Figure 43 : Effets de l'exposition au MG de la mère sur la modulation de la sécrétion de l'insuline par le pancréas chez la descendance. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; C (n= 8), RA (n=8) et MG (n=8). **: P<0.001 ***: P<0.0001	143

Figure 44 : Test IPGTT chez les animaux C et MG. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; C (n= 8) et MG (n=8).* P< 0.05	144
Figure 45 : Effet du MG sur la sécrétion de l'insuline par la cellule pancréatique (descendants des mères du groupe C et du groupe RA).Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; C (n= 8), RA (n=8) et MG (n=8). **:	144
Figure 46 : Schéma récapitulatif de l'effet des AGEs issus des formules sur les modifications du microbiote intestinal et la programmation du stress oxydant chez l'adulte.	161

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les causes et les conséquences de RCIU en fonction de l'espèce.....	36
Tableau 2 : Composition du lait maternel (FAO, 1998; Lebeuf Y., 2002).....	53
Tableau 3: Comparaison de la composition du lait humain et du lait de vache.....	55
Tableau 4 : Comparaison de la composition en acides aminés du lait maternel et du lait de vache.....	57
Tableau 5 : Comparaison qualitative des lipides du lait de vache et du lait maternel	58
Tableau 6 : Séquences des gènes d'intérêts SOD et GPX	105
Tableau 7 : Les séquences des oligonucléotides utilisées pour la PCR quantitative....	116
Tableau 8 : Coefficients de corrélation entre les indices de diversité à PND36 et PND54 chez le porcelet RCIU	131
Tableau 9 : La répartition des groupes expérimentaux de l'étude.....	139

AVANT-PROPOS

D'après l'OMS, en 2008, les maladies chroniques ont causé la mort de 36 millions de personnes, soit 60% des décès dans le monde contre 40% pour les maladies infectieuses. 80% de ces décès ont eu lieu dans les pays à revenu faible ou modéré. Ce problème devient une source de préoccupation majeure en santé publique. Face à cette situation alarmante, l'OMS a décrété l'urgence de la mise en place d'actions préventives et de mesures effectives visant à lutter contre l'explosion de ces maladies.

Classiquement, on a toujours attribué l'augmentation galopante des pathologies chroniques au mode de vie occidentale. L'alimentation très riche et la sédentarité ont toujours été considérées comme des facteurs de risque majeurs de développement de l'obésité, du diabète et des maladies cardiovasculaires. Il n'en reste pas moins que dans certains pays, comme l'Angleterre, la diminution substantielle de l'alimentation énergétique et le renforcement des activités physiques ne se sont pas accompagnés, d'après les derniers chiffres de l'OMS, d'une diminution significative de la prévalence d'obésité et des maladies métaboliques. Cette analyse, selon laquelle les maladies chroniques sont dues au déséquilibre alimentaire et au manque d'exercices physiques, apparaît aujourd'hui très insuffisante pour expliquer l'augmentation des pathologies chroniques. De plus en plus de données scientifiques montrent la nécessité de considérer l'ensemble des causes pouvant expliquer cette épidémie ; parmi celles-ci, l'exposition aux composés chimiques environnementaux occupe une place importante (Alonso-Magdalena et al, 2010; Arisawa et al, 2005; Barr et al, 2007; Casals-Casas et al, 2008). L'augmentation des maladies chroniques serait alors liée non seulement au mode de vie occidentale mais résulterait aussi d'un «environnement toxique». La première synthèse concernant l'implication des contaminants alimentaires a été publiée par (Baillie-Hamilton, 2002). Elle a montré que certains composés chimiques environnementaux perturbent le système hormonal et contribuent à aggraver le phénotype de l'obésité. Le tissu adipeux a été pris pour exemple car ce tissu, en plus d'un lieu de stockage énergétique, est sous contrôle hormonal et libère lui-même des substances inflammatoires. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs substances chimiques «xénobiotiques», issues des pratiques culturelles et des procédés industriels très variés, pourraient altérer le fonctionnement de notre organisme et menacer son intégrité. Ceci est particulièrement alarmant lorsqu'il s'agit de populations vulnérables comme les femmes enceintes, les enfants et les personnes âgées qui sont plus menacés du fait de leur statut physiologique fragile et de leur vulnérabilité face aux agressions de l'environnement. En dépit des mesures prises en termes de contrôle de la

qualité sanitaire des aliments, il a été montré, qu'en raison de certains modes de production et de procédés de fabrication, la matrice alimentaire comporte plusieurs contaminants chimiques. Certaines de ces substances, comme les produits de glycation (AGEs alimentaires) ou les MRPs issus du traitement thermique des aliments, se retrouvent même de manière tout à fait accidentelle et en grande quantité. Plusieurs évidences scientifiques montrent que ces composés jouent le rôle de «glycotoxines» car leur présence dans l'organisme est associée au développement de diverses pathologies telles que le diabète, la défaillance rénale, les maladies cardiovasculaires...

Si la littérature est très abondante au sujet des effets des AGEs alimentaires sur la santé de l'adulte, les champs de connaissance sur leurs effets potentiels à court, moyen et long terme chez le fœtus/enfant restent encore non exploités

C'est dans ce cadre que mon travail de thèse a vu le jour. Dans un premier temps, la synthèse bibliographique de ce manuscrit décrira les processus de programmation développementale et le concept du DOHAD, la physiopathologie du RCIU (retard de croissance intra-utérine) et les pathologies qui lui sont associés. Ensuite seront décrits les produits de glycation avancée (AGEs) et leurs effets physiopathologiques, avec un focus sur le rein et le pancréas.

Dans un second temps, une description des principaux résultats sous forme de trois publications: la première montrant les effets des AGEs des formules lactières sur la programmation du stress oxydant et de l'inflammation, au travers de l'étude menée sur le modèle porcin RCIU. La seconde, sur l'impact des AGEs des formules lactières sur le microbiote intestinal et la programmation du stress oxydant au niveau du colon. Enfin dans la dernière partie de ce manuscrit sont présentés une publication sur les effets du méthylglyoxal (MG) sur la modulation de la synthèse de l'insuline par la cellule pancréatique ainsi que des résultats préliminaires sur les effets du MG sur la programmation fœtale du diabète.

PARTIE I: Synthèse Bibliographique

CHAPITRE I: Conditionnement de la santé à long terme

I.1 La programmation développementale

I.1.1 Origine du concept de la programmation développementale

Les maladies chroniques, au premier rang desquelles se trouvent les maladies métaboliques, sont en augmentation constante depuis plus d'un demi-siècle. Leur prévalence, la mortalité associée (60% des décès dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé) ainsi que le coût de santé engendré constituent une situation qualifiée d'épidémie mondiale par l'Organisation des Nations Unies (ONU).

Ces maladies ont été, dans un premier temps, imputées principalement à des facteurs génétiques, au mode de vie sédentaire et à une alimentation trop riche. Les recherches sur les mécanismes de mise en place de ces pathologies ont néanmoins amorcé un changement de paradigme ces dernières années à l'aube du concept de **la programmation développementale** proposée par l'équipe de Barker (Barker, 1990; Barker, 2004; Hales & Barker, 1992; Lucas, 1991; Lucas, 1998). Selon ce concept, un stimulus ou une agression, survenant lors de fenêtres critiques de développement (grossesse et/ou période post-natale précoce), pourraient avoir des répercussions sur la santé de l'adulte et être à l'origine de certaines pathologies. Les fenêtres développementales critiques de la programmation sont résumées dans la Figure 1.

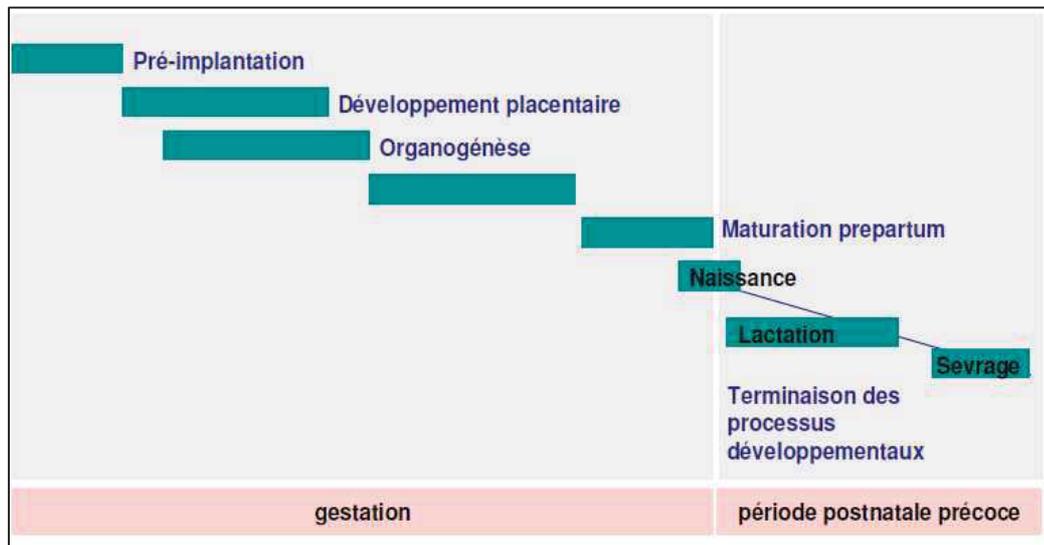


Figure 1 : Phases critiques de développement de la programmation. Adapté d'après (Fowden et al, 2006)

Même si l'exposition à des toxines environnementales (pollution), le mode de vie (activité physique, sommeil) et le stress psychosocial (Bloomfield et al, 2013) sont aujourd'hui clairement identifiés comme des éléments déterminants de l'environnement précoce, le stress nutritionnel (carences, famines, surnutrition) reste néanmoins le facteur principal de la programmation développementale. En effet, des évidences épidémiologiques et des études expérimentales ont apporté les preuves de l'existence d'une association entre les perturbations de l'environnement nutritionnel précoce et l'incidence des pathologies métaboliques (Martins, 2003). La famine d'Amsterdam (1944-1945) est la première étude épidémiologique sur laquelle s'est basé Barker. Dans cette étude, Barker a montré que dans des conditions de privation nutritionnelle *in-utero* sévère, le fœtus serait programmé vers un phénotype économe (« Thrifty Phenotype »), adapté à cet environnement. Par la suite, ces mêmes enfants soumis à une alimentation normale se sont retrouvés dans une situation de « mismatch », se traduisant par une suralimentation relativement à leur phénotype économe; ce qui a conduit au développement de diverses pathologies métaboliques comme l'obésité, l'hypertension et le diabète de type 2.

Ce concept de programmation développementale a incité l'OMS et l'UNICEF à lancer l'initiative des "1000 jours" (<http://www.thousanddays.org/>) dans le but de sensibiliser les populations à risque à l'importance de la nutrition pendant la grossesse et les deux premières années de vie de l'enfant (Simeoni et al, 2014).

I.1.2 Les mécanismes épigénétiques de la programmation développementale

On regroupe sous le terme de modifications épigénétiques plusieurs mécanismes différents comme l'addition de groupements chimiques sur la molécule d'ADN ou sur les protéines de la chromatine (les histones) sans modifier sa séquence de bases. La chromatine est la forme sous laquelle est compacté l'ADN dans le noyau de la cellule. Elle correspond à l'association de l'ADN et de petites protéines appelées histones. Le compactage de l'ADN dans la chromatine est assuré par son enroulement sur un octamère d'histones, le nucléosome (Figure.2). Parmi les mécanismes épigénétiques figurent notamment la méthylation de l'ADN qui se retrouve principalement dans les cytosines des séquences de dinucléotides cytosine phosphate guanine (CpG) (Jaenisch & Bird, 2003) et qui stabilise l'expression des gènes dans les cellules. Les modifications des histones par phosphorylation, acétylation ou méthylation (Wolffe & Matzke, 1999) sont susceptibles de contrôler la structure-fonction de la chromatine et d'avoir des conséquences sur l'activation de la transcription. La reconnaissance de la chromatine par des ARN non codants est également un mécanisme épigénétique contrôlant l'expression des gènes, l'établissement des domaines chromatiniens et la stabilité du génome.

De plus en plus d'évidences montrent que les mécanismes épigénétiques sont impliqués dans la programmation développementale des pathologies. Citons l'étude de Park et al. (2008) qui ont montré que le développement du diabète chez le RCIU ayant subi une restriction protéique au cours de la gestation, est associé à une perte d'un facteur de liaison en amont de l'extrémité proximale du promoteur du gène *Pdx1*, facteur de transcription clef pour le développement des cellules β pancréatiques ainsi que la sécrétion de l'insuline (Park et al, 2008). Un recrutement de l'histone désacétylase 1 et du corépresseur Sin3A et la désacétylation des histones H3 et H4 ont été mis en évidence, expliquant cette baisse de la transcription du gène *Pdx1*. De même, sur un même modèle de restriction protéique, Plagemann (2009) a montré une hypométhylation du gène codant pour le récepteur à l'angiotensine de type 1b (*AT1b*) dans les glandes surrénales de la descendance. Cette diminution de la méthylation d'*AT1b* s'est accompagnée d'une surexpression du récepteur *AT1b*, impliqué dans le phénomène de l'hypertension observé chez les descendants (Plagemann et al, 2009).

Chez l'Homme, la famine hollandaise de 1944 a permis de montrer les effets de la dénutrition périnatale sur la régulation épigénétique (Roseboom et al, 2011). Plus spécifiquement, les auteurs ont mis en évidence, 60 ans après la survenue de cette famine, une

diminution de la méthylation de l'ADN du gène d'IGF2 chez la descendance née avec un faible poids. Ces résultats attestent vraisemblablement que le génome a gardé en mémoire l'empreinte du stress nutritionnel subi au cours de la gestation. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle, aucune preuve directe de transmission de ce remaniement épigénétique aux générations issues des petits enfants. Des analyses, portant sur les poids de naissance de la descendance de femmes dénutries, a en revanche montré que ce paramètre restait inférieur par rapport à la descendance de femmes non exposées (Lumey, 1992; Veenendaal et al, 2013). L'étude de Burdge et al. (2007) a montré une perturbation de la méthylation des gènes hépatiques codant pour PPAR α (un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation du métabolisme lipidique ainsi que dans la réponse inflammatoire) et le récepteur GR (récepteur aux glucocorticoïdes) sur deux générations de rongeurs RCIU (Burdge et al, 2007) (F1 et F2). Ces résultats plaident en faveur d'un effet épigénétique mémoire, transmissible à long terme ; d'où son importance dans la compréhension des mécanismes de programmation développementale. Le même constat a également été établi récemment par Skinner et al. (2013) qui ont montré que les facteurs environnementaux peuvent moduler, de manière transgénérationnelle, les cellules germinales primordiales (Skinner et al, 2013).

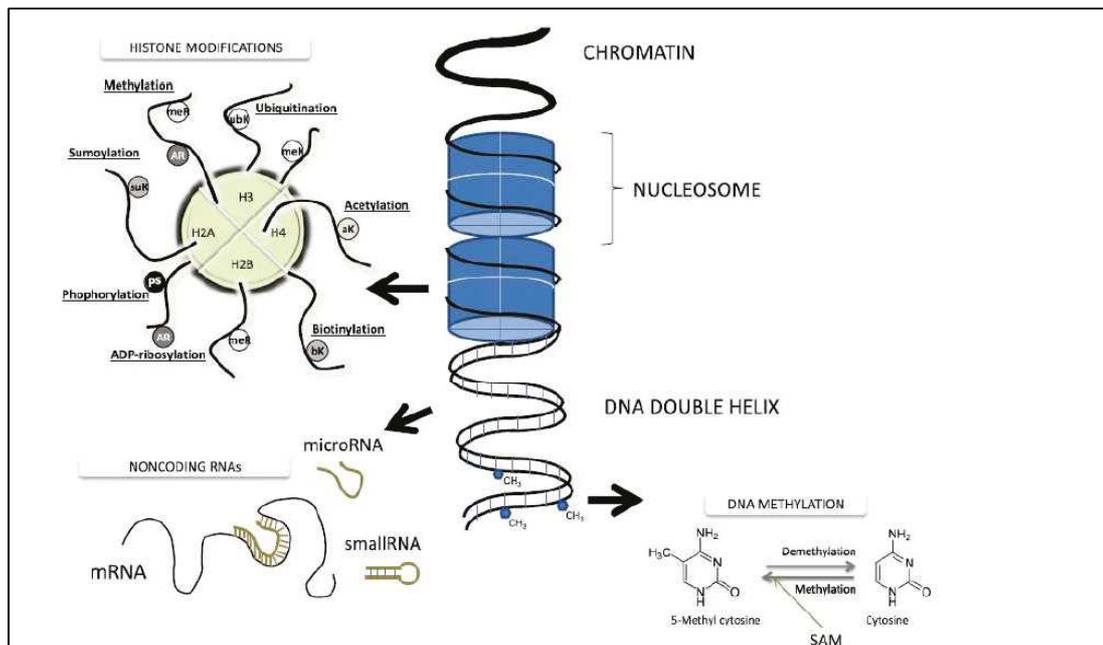


Figure 2: Mécanisme de la régulation épigénétique: L'expression génique est activée ou réprimée par les groupements méthyles dépendants, qu'ils soient fixés ou non sur l'ADN. L'enroulement de l'ADN est modifié par les groupements acétyles qui, en interagissant avec les histones, modulent par conséquent l'activité génique.

I.1.3 Le retard de croissance intra-utérin

Définition, prévalence et étiologie

Pour l'OMS, tout enfant né avec un poids inférieur à 2500 grammes, est considéré comme ayant un faible poids à la naissance (WHO, 2014). Deux catégories de faible poids de naissance peuvent être définies: **la prématurité** et le **Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU)**. Les nouveau-nés de ces deux catégories sont extrêmement fragiles mais présentent un risque de mortalité et de morbidité différent.

Selon l'OMS, la prématurité se caractérise par un âge gestationnel inférieur à 37 semaines d'aménorrhée tandis que le RCIU correspond à un bébé né vivant avec un poids de naissance inférieur au 10^{ème} percentile du poids de l'âge gestationnel selon une courbe de référence (Figure 3).

Cette dernière pathologie est également appelée «hypotrophie fœtale». Elle est expliquée par une anomalie dynamique de croissance *in utero* du fœtus. Le RCIU se trouve incapable d'assurer une croissance optimale, soit à cause de problèmes de grossesse qui freinent son développement, soit à cause des facteurs extérieurs ou génétiques qui se

réunissent pour moduler ce potentiel de croissance. Autrement dit, le RCIU est «un fœtus qui n'a pas atteint son potentiel de croissance» (ACOG 2000).

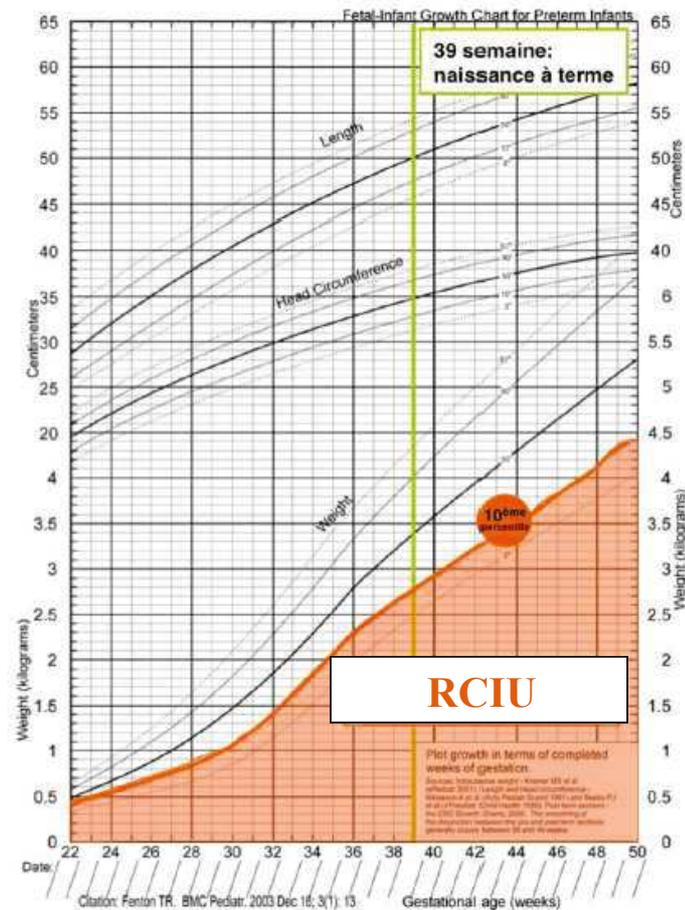


Figure 3: Courbe de croissance fœtale et infantile (modifiée à partir de Fenton, 2003)

A travers le globe, plus de 20 millions d'enfants naissent chaque année avec un RCIU, ce qui représente 17% des naissances mondiales (UNICEF) (ONU) (Birthweight, 2004).

Deux types de RCIU ont été identifiés:

- Le RCIU symétrique ou harmonieux (30% des cas) : les paramètres taille, poids et périmètre crânien du fœtus sont altérés. Cette pathologie résulte d'une altération précoce (2^{ème} trimestre de la grossesse) du développement fœtal.
- Le RCIU asymétrique ou disharmonieux (70% des cas): la croissance cérébrale est relativement conservée, seule la croissance pondérale est touchée. Ce retard résulte d'une altération plus tardive (3^{ème} trimestre de la grossesse) de la croissance fœtale.

Aucune étude à ce jour ne fournit une vue d'ensemble de la prévalence mondiale des RCIU, souvent confondus, dans les études épidémiologiques, avec les prématurés. Les données collectées par Onis et al. (1998) et confirmées par Katz et al. (2013) (de Onis et al, 1998; Katz et al, 2013). dans les pays en développement sont résumées dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**(de Onis et al, 1998) (Figure 4)

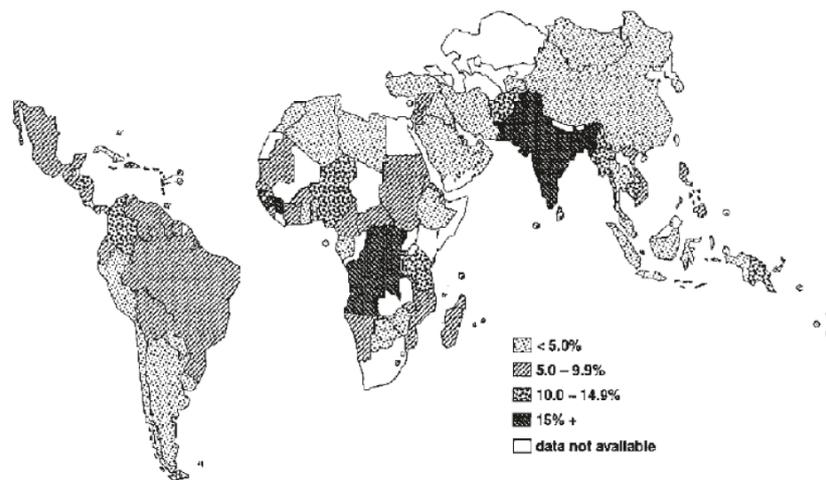


Figure 4 : La répartition géographique de la prévalence du RCIU dans les pays en développement (de Onis et al, 1998)

Les causes de la survenue d'un retard de croissance intra-utérin sont nombreuses. Elles sont liées principalement à une défaillance fœtale, maternelle ou placentaire (Hendrix & Berghella, 2008; Saenger et al, 2007). Toutefois, dans 30% des cas de RCIU, les causes et les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent inconnus. La figure ci-dessous (Figure 5) résume les causes majeures ainsi que les conséquences de la programmation intra-utérine.

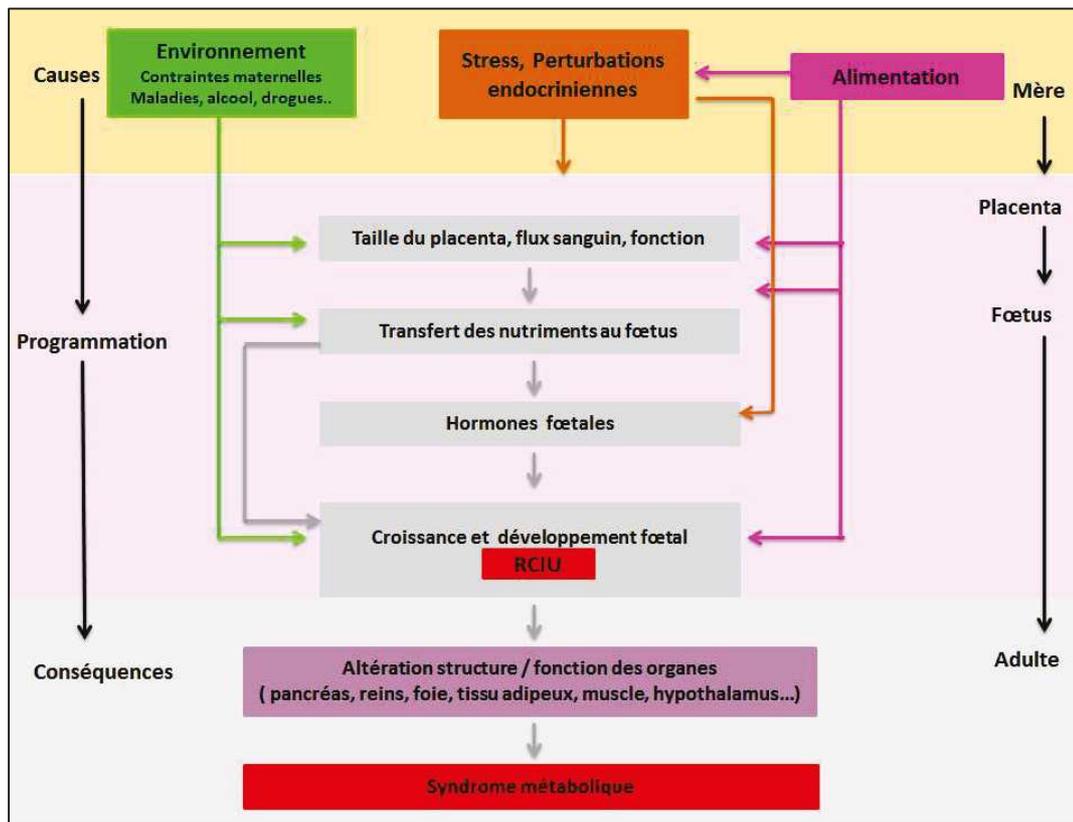


Figure 5 : Les principales causes et conséquences de la programmation intra-utérine. D'après (Fowden & Forhead, 2004; Fowden et al, 2006)

Origine Maternelle

La nutrition constitue un facteur crucial à prendre en considération dans le développement fœtal. Il est clair qu'une restriction nutritionnelle maternelle a des répercussions sur la croissance fœtale (Fleischer Michaelsen et al, 2000

) Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que la mauvaise nutrition maternelle constitue la première cause de RCIU (Mandrizzato et al, 2008).(ACC/SCN 2000; Mandrizzato, Antsaklis et al., 2008).

De nombreuses études épidémiologiques ont rapporté l'effet bénéfique de la supplémentation de la femme enceinte en protéines (Viegas et al, 1982),(Godfrey et al, 1996),, vitamines et oligo-éléments (Friis et al, 2004; Gupta et al, 2007; Osrin et al, 2005) dans la réduction du risque de survenue du RCIU (Zerfu & Ayele, 2013). Il s'avère aussi que la consommation de substances comme les drogues, l'alcool, le tabac ou certains médicaments, pendant la grossesse, accroît le risque de survenue d'un retard de croissance. Hoegerman et al. (1990) ont montré que l'alcool empêche la croissance fœtale, via la perturbation du

développement vasculaire utérin, induisant une baisse du flux sanguin au niveau du placenta (Hoegerman et al, 1990; Kay et al, 2000).

L'âge de la mère ainsi que la primiparité ont aussi un effet sur le développement du fœtus. En effet, Ong et al. (2004) ont rapporté que, chez une femme primigravide, le nouveau-né présente un poids à la naissance plus faible que celui des bébés ultérieurs. D'autre part, l'âge de la mère présente aussi un facteur de risque, en particulier chez les mères de moins de 16 ans. Une grossesse multiple peut également conduire à une croissance plus lente *in utero*, survenant à 30-31 semaines de gestation dans le cas de jumeaux, 27-28 semaines dans le cas de triplés et 25-26 semaines dans le cas de quadruplés (Newman, 2002).

Les pathologies maternelles telles que le diabète, l'hypertension et l'anémie, influencent fortement la croissance fœtale et augmentent le risque de RCIU (Mandrizzato et al, 2008). Dans le cas d'un diabète gestationnel, la perturbation de la glycémie maternelle entraîne une altération de la croissance du fœtus suite à la diminution du taux de glucose dans la circulation ombilicale (Scholl et al, 2001).

Enfin, l'exposition de la mère à des conditions stressantes (stress psychologique) au cours de la période de grossesse influence fortement le développement fœtal (Lipkind et al, 2010).

Origine placentaire

Le développement optimal du fœtus dépend des conditions de croissance et de développement *in utero*. L'apport en oxygène et en nutriments, traversant la barrière placentaire, doit être suffisant et capable de combler ses besoins (Ounsted et al, 1988). La perturbation de la fonction physiologique du placenta semble être la principale conséquence d'une mauvaise nutrition fœtale (Jansson & Powell, 2007), ce qui se traduit par une mauvaise croissance intra-utérine.

Afin de satisfaire les besoins métaboliques croissants du fœtus, les flux et les volumes sanguins au niveau des circulations ombilicale et utérine augmentent progressivement durant la période de grossesse. En effet, l'augmentation de la surface d'échange est assurée par un diamètre artériel plus important et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les études de Jansson et al. (2007) ont montré que les flux et les volumes sanguins ombilical et utérin sont réduits et les résistances au flux sont augmentées en cas de grossesse avec RCIU.

De plus, la restriction des échanges mère-fœtus peut être le résultat d'une malformation structurelle du placenta qui prend place au cours de la formation du tissu placentaire. En effet, Kingdom et al. (2000), en comparant des individus normaux aux RCIU, ont observé chez ces derniers une altération au niveau de la structure de leur placenta qui s'est traduite par des villosités atrophiées, une ramification placentaire réduite et une faible innervation. Cet environnement placentaire appauvri contribue à l'altération de la croissance fœtale en déviant la trajectoire de croissance vers la pathologie du RCIU (Kingdom et al, 2000).

Origine fœtale

En plus des origines maternelles et placentaires, la survenue du RCIU a aussi une origine fœtale (Figure6) qui regroupe les anomalies génétiques, les infections et également les malformations structurales. En ce qui concerne les maladies génétiques, Sebogal et al. (2007) ont montré qu'elles représentent 5 à 20% des causes de RCIU. Ainsi, la restriction de la croissance peut être la conséquence d'une altération chromosomique (trisomie 21, 18, 13), d'une délétion chromosomique (syndrome Wolf-Hirschhorn et syndrome de Turner) (Rochelson et al, 1990). D'autre part, au cours de la grossesse, la croissance fœtale peut être perturbée par des maladies infectieuses telles que la toxoplasmose, la rubéole, l'herpès et le paludisme(Khan & Kazzi, 2000). Les infections sont responsables de 10% des cas de RCIU. Il est à noter également que les maladies infectieuses peuvent induire, outre les RCIU, des naissances prématurées (Goldenberg et al, 2005).

Les modèles de RCIU expérimentaux et naturels

Afin de mieux comprendre les mécanismes génétiques, moléculaires et cellulaires impliqués dans la restriction fœtale de croissance, plusieurs modèles animaux mimant la situation chez l'homme ont été développés. Comme chez l'humain, le RCIU existe également naturellement chez les animaux domestiques.

Modèles expérimentaux du RCIU

De nos jours, la connaissance des mécanismes sous-jacents induisant une croissance fœtale restreinte joue un rôle important dans la prévention du RCIU. De nombreux protocoles expérimentaux ont été développés en reproduisant les altérations à la base de l'étiologie du RCIU humain. Les principales stratégies utilisées sur plusieurs espèces sont listées dans le

Tableau 1. Les manipulations alimentaires, la restriction du flux sanguin placentaire et l'administration de glucocorticoïdes sont les principales stratégies adoptées pour induire une restriction de croissance. En effet, les conséquences varient en fonction des manipulations et de l'espèce utilisée comme le montre le

Tableau 1.

Tableau 1 : Les causes et les conséquences de RCIU en fonction de l'espèce.

Manipulation	Conséquences	Espèce	Références
Restriction Protéique	Hypertension	Rat	(Langley-Evans, 1997; Langley et al, 1994a; Vehaskari et al, 2001; Woods et al, 2001)
	Insulino-résistance / Intolérance au glucose	Rat	(Langley-Evans, 1997; Langley et al, 1994a; Langley et al, 1994b; Ozanne, 2001; Stocker et al, 2004; Vehaskari et al, 2001; Woods et al, 2001)
	Défaut sécrétion insuline	Rat	(Crace et al, 1991; Snoeck et al, 1990; Wilson & Hughes, 1997)
Restriction calorique	Hypertension	Cobaye Rat Brebis	(Edwards & McMillen, 2001; Kind et al, 2002; Vickers et al, 2000; Woodall et al, 1996)
	Insulino-résistance / Intolérance au glucose	Cobaye Rat	(Holemans et al, 1996; Kind et al, 2003)

	Adiposité / diet induced obesity	Cobaye Rat	(Kind et al, 2005; Vickers et al, 2000; Yura et al, 2005)
Insuffisance placentaire	Insulino-résistance / défaut de sécrétion d'insuline	Rat	(Jansson & Lambert, 1999; Simmons et al, 2001)
	Hypertension	Rat Cobaye Brebis	(Merlet-Benichou et al, 1994; Murotsuki et al, 1997; Persson & Jansson, 1992)
Surexposition aux glucocorticoïdes	Hypertension	Rat Brebis	(Benediktsson et al, 1993; Gatford et al, 2000; Sugden et al, 2001)
	Insulino-résistance / Intolérance au glucose	Rat Brebis	(Lindsay et al, 1996; Moss et al, 2001; Nyirenda et al, 1998)

Le porc : un modèle naturel du RCIU

La croissance du fœtus dans l'utérus est un événement biologique complexe influencé par la génétique, l'épigénétique et d'autres facteurs environnementaux, ainsi que par la maturité maternelle. Ces facteurs ont une incidence sur la taille et la capacité fonctionnelle du placenta (transfert de nutriments et d'oxygène de la mère au fœtus), la disponibilité des éléments nutritifs nécessaires, le milieu endocrinien et les voies métaboliques. L'altération de l'état nutritionnel et endocrinien fœtal peut entraîner des adaptations de développement qui changent en permanence la structure, la physiologie, le métabolisme et la croissance postnatale de la progéniture. Le phénomène de RCIU est donc largement observé chez les animaux domestiques (Wu et al, 2006)..Chez le porc, le modèle naturel du RCIU est issu des conséquences de la sélection animale sur la taille de la portée. Le croisement de la lignée chinoise Meishan hyperprolifique avec la race occidentale, est largement impliqué dans le phénomène RCIU dans les élevages (Herpin & J., 1998).. La présence d'un nombre élevé de

fœtus limite la croissance fœtale et diminue le flux sanguin utérin. Les fœtus se retrouvent donc face à une quantité de substrats énergétiques insuffisante, ce qui contribue à un phénomène de compétition utérine et à la naissance de porcelets avec des poids variables (Pere & Etienne, 2000). Les individus de petit poids, dits à risque, souffrent d'une immaturité de leur fonction respiratoire, de leur tractus digestif, de leur système rénal ainsi que d'une perturbation de la régulation de la température corporelle. Ces conditions physiologiques inadéquates rendent leur survie difficile et augmentent le risque de mortalité néonatale. Ceci représente un problème majeur de management dans les élevages (Wu et al, 2006).

Pour ces raisons, et du fait de la forte ressemblance des processus de croissance et de développement des organes entre le porc et l'homme, le modèle porcin naturel de retard de croissance est aujourd'hui de plus en plus utilisé pour l'étude de la programmation développementale. Ce modèle a permis notamment de montrer le rôle joué par la leptine postnatale dans la programmation métabolique et l'obésité (Attig et al, 2008a; Attig et al, 2013b; Mostyn et al, 2014).

I.1.4 La programmation développementale des maladies chez le RCIU

Les maladies non transmissibles (MNT) ou encore maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, le cancer sont responsables de 87% de tous les décès en France. Ces maladies évoluent lentement avec l'âge. Les maladies cardiovasculaires (28%) et le cancer (31%) sont les plus abondants (OMS, 2014)(Figure 6).

Mortalité proportionnelle (% des décès totaux, tous âges confondus, hommes et femmes)

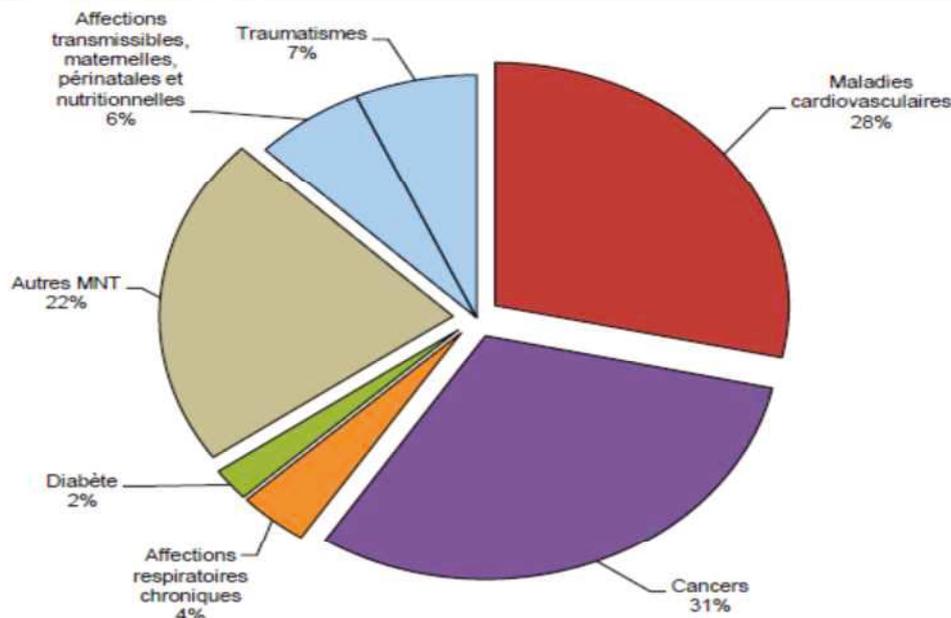


Figure 6 : principales causes de mortalité (OMS, 2014)

a) La programmation du diabète chez le RCIU

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par une augmentation du taux de glucose (sucre) dans le sang. Selon l'OMS, 347 millions de personnes sont diabétiques dans le monde. Le diabète pourrait devenir la septième principale cause de décès dans le monde d'ici 2030 (Danaei et al, 2011; WHO, 2012). Cet excès chronique est appelé hyperglycémie. On distingue deux types de diabète: le diabète de type 1 et le diabète de type 2.

Le diabète de type 1 est une maladie dite auto-immune due à l'arrêt de la sécrétion de l'insuline par le pancréas. En effet, l'organisme produit des anticorps qui détruisent progressivement la cellule bêta pancréatique responsable de la sécrétion d'insuline. Cette maladie apparaît tôt dans la vie de l'enfant, de l'adolescent et du jeune adulte, avant l'âge de 30 ans (Cryer, 2001).

Le diabète de type 2 est beaucoup plus répandu. Cette pathologie représente 90% des cas de diabète rencontrés dans le monde (Danaei et al, 2011). Cette maladie est due à une mauvaise utilisation de l'insuline par les cellules de l'organisme, induisant un état d'insulino-résistance. Il apparaît plutôt chez des sujets de plus de 40 ans mais peut aussi s'installer chez de jeunes obèses.

Diverses études ont mis en évidence une forte corrélation entre un petit poids à la naissance et le développement d'un état d'intolérance au glucose et de diabète de type 2 à

l'âge adulte. Ceci a été observé chez l'homme (Hales & Barker, 1992; Lithell et al, 1996; Phillips et al, 1994; Phipps et al, 1993; Valdez et al, 1994) et également dans différents modèles animaux de RCIU comme le montre le Tableau 1.

Ainsi, Hales et al.(1991) ont montré que sur 370 hommes âgés entre 59 et 70 ans, 40% des personnes nées avec un poids de naissance faible (< 2.5 Kg) présentaient un problème de tolérance au glucose et/ou un diabète de type 2. Cependant, ces troubles de la régulation de la glycémie n'ont été observés que chez 5% des individus nés avec un poids et une croissance standards. Les études de Leger et al. (1997) et Dabelea et al. (1999) ont confirmé l'étude précédente, montrant que les individus RCIU sont sujets à des problèmes de métabolisme glucidique et développent une insulino-résistance à l'âge adulte, voire plus précocement (Dabelea et al, 1999; Leger et al, 1997; Leger et al, 1996). Plus tardivement, Ibanez et al. (2006) et Wang et al. (2007) ont montré que la sensibilité à l'insuline peut se mettre en place précocement chez des individus en bas âge, voire chez les nouveau-nés RCIU (Ibanez et al, 2006; Wang et al, 2007).

La programmation périnatale est aujourd'hui suffisamment avancée pour expliquer la prédisposition des individus nés RCIU à développer une intolérance au glucose, voire un diabète de type 2. Dans ce cadre, l'environnement fœtal n'est pas le seul à influencer l'altération du métabolisme glucidique. La période postnatale, période critique de croissance, peut aussi avoir un pouvoir puissant dans l'installation du diabète de type 2 et de la sensibilité au glucose chez les enfants RCIU. Ce constat est d'autant plus vrai chez les individus présentant un rythme de croissance accéléré au cours de leurs premières années de vie (Forsen et al, 2000; Ibanez et al, 2006). En effet, Hales et Barker ont expliqué ce mécanisme en supposant que les troubles observés précocement chez les individus nés avec RCIU pourraient être la conséquence d'une altération du développement des cellules bêta pancréatiques et de leur capacité à sécréter l'insuline (Hales & Barker, 1992). En se basant sur différents modèles animaux, plusieurs études ont confirmé l'hypothèse émise par Barker et Hales, tout en montrant que cette altération de la croissance fœtale *in utero* joue un rôle primordial dans la perturbation du développement des cellules pancréatiques, ce qui entraîne non seulement une réduction du nombre et de la masse des cellules bêta mais également des îlots de Langerhans, responsables de la sécrétion d'insuline (Garofano et al, 1997; Holemans et al, 1996).

D'autres études faites chez le rat et la brebis ont étayé ces constatations et ont permis de montrer la présence d'une réduction de la prolifération cellulaire associée ou non à une augmentation de l'apoptose au sein des îlots (Limesand et al, 2005; McMillen & Robinson, 2005; Snoeck et al, 1990). Cette altération structurale du pancréas endocrine a été associée à

une baisse de la fonction des îlots. Ceci conduit à des changements des réponses cellulaires vis-à-vis des hormones, se traduisant par des niveaux d'hormones circulantes plus faibles (Cherif et al, 1998; Holemans et al, 1996) et une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse à une charge en glucose (Cherif et al, 1998; Holemans et al, 1996; Wilson & Hughes, 1997).

La genèse de l'insulino-résistance observée chez les RCIU est encore controversée et le débat n'est pas tranché entre un défaut primaire du pancréas ou une mise en place plus complexe impliquant les tissus périphériques. Ainsi chez l'homme, Van Assche et al. (1977) ont montré la présence d'une baisse de masse du pancréas endocrine et du nombre de cellules béta chez certains fœtus RCIU (Van Assche et al, 1977). Cependant, en 2002, Beringue et al., en se basant sur une analyse morphométrique de pancréas de fœtus humains RCIU, d'âge moyen 36 semaines de gestation, n'ont pas observé de différence ni sur le nombre de cellules, ni sur la densité cellulaire, ni sur l'organisation des îlots. Chez l'homme, ceci serait dû au développement d'une résistance des tissus périphériques à l'insuline plutôt qu'à un défaut primaire de sa sécrétion. Par contre, les études faites sur des modèles animaux ont montré la présence de ces deux phénomènes. Chez le rat par exemple, il a été démontré que l'insulino-résistance se développe au niveau du foie, du muscle et du tissu adipeux. Tout d'abord, l'altération fonctionnelle au niveau du foie engendre une sensibilité à l'insuline due à une hyperactivité des enzymes de la néoglucogenèse (Desai et al, 1997) ainsi qu'une altération de la régulation de la production hépatique du glucose (Holemans et al, 1996; Ozanne & Hales, 1999; Vuguin et al, 2004). Les analyses morphologiques ont également montré une prolifération accrue des hépatocytes associée à une augmentation de la taille et de la capacité de ces cellules (Burns et al, 1997; El-Khattabi et al, 2003). D'autre part, au niveau du muscle et du tissu adipeux, la résistance à l'insuline altère fortement le métabolisme du glucose. Lorsque la résistance à l'insuline prend place, une réduction du captage du glucose dans ces tissus est observée. Elle est expliquée par un défaut de signalisation induisant une baisse marquée de la translocation membranaire du récepteur Glut 4, nécessaire pour le transfert de glucose (Ozanne et al, 2005; Thamocharan et al, 2005). De plus, l'insulino-résistance entraîne une réduction de l'action anti-lipolytique de l'insuline (Jaquet et al, 2000; Ozanne & Hales, 1999).

b) Programmation de l'hypertension et de la défaillance rénale chez le RCIU

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont montré la présence d'une relation inverse entre le faible poids de naissance (Barker et al, 1989; Gennser et al, 1988; Leon et al, 2000) et les maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (Osmond et al, 1993). En effet, la cohorte appartenant au programme «British births survey», menée sur 9921 enfants et 3259 adultes âgés de 36 ans, a montré que les enfants nés avec un petit poids de naissance présentaient une élévation de la pression systolique de 0.38 mm Hg et de 1.32 mm Hg, respectivement pour les garçons et les filles. De plus, chez les adultes, la pression artérielle a été augmentée de 2.57 mm Hg et de 1.83 mm Hg, respectivement pour les hommes et les femmes nés avec un RCIU (Barker et al, 1989). Cette étude dénote l'importance du poids de naissance et le rôle clé que joue le RCIU dans le développement de la pression artérielle. Les études animales viennent aussi confirmer ces observations. En effet, chez le porc âgé de 3 mois, le RCIU est associé à une élévation de la pression artérielle (Poore & Fowden, 2003). Chez le rat, le retard de croissance induit par la restriction calorique ou protéique du régime alimentaire maternel s'accompagne également d'une hypertension (Langley-Evans & Nwagwu, 1998; Vickers et al, 2000).

Il est à noter que le rein est l'organe le plus touché par la programmation de l'hypertension. En effet, il a été démontré que le faible poids de naissance et la sous-nutrition sont associés à une réduction de la taille et à des modifications de la structure rénales (Langley-Evans & Nwagwu, 1998; Vickers et al, 2000). En plus de l'homme, les études menées sur de nombreux modèles animaux (le porc, la brebis et le rat) ont montré que l'individu né avec un retard de croissance intra-utérin à la naissance présente une diminution du nombre de néphrons (Bauer et al, 2002; Langley-Evans & Nwagwu, 1998; Wintour et al, 2003), une réduction du nombre de glomérules et un volume glomérulaire élevé (Manalich et al, 2000). Ces modifications structurales et fonctionnelles rénales semblent être irréversibles et non compensées pendant la période postnatale (Woods et al, 2001). Face à ce nombre réduit de glomérules, la filtration rénale s'appuie sur un nombre faible de néphrons. Ceci induit une élévation de pression glomérulaire, ce qui conduit au développement d'une sclérose glomérulaire à long terme, suivie d'une baisse de la filtration glomérulaire. Ces contraintes fonctionnelles plaident en faveur d'une insuffisance rénale contribuant à une rétention du sodium et favorisant l'installation d'une hypertension artérielle (McMillen & Robinson, 2005; R.V. Salamon, 2009).

c) La prédisposition de l'obésité chez les RCIU : le phénomène de « catch-up growth »

Ravelli et al. ont été les premiers à montrer l'existence d'une association entre un petit poids de naissance et l'augmentation de l'obésité chez l'adulte (Ravelli et al, 1999; Ravelli et al, 1976). Depuis, plusieurs études se sont intéressées à ce sujet, montrant que les individus RCIU présentent, à l'âge adulte, un indice de masse corporelle (IMC) et une masse grasse totale plus élevés, associés à une redistribution du tissu adipeux au niveau abdominal (obésité viscérale). Ceci indique une altération de leur composition corporelle (Jaquet et al, 2000; Yajnik, 2004).

Cet excès d'adiposité chez les enfants RCIU est induit par un phénomène particulier appelé «catch-up growth» (Hokken-Koelega et al, 1995; Karlberg & Albertsson-Wikland, 1995; Monteiro & Victora, 2005; Stettler et al, 2005). En effet, ce phénomène est généralement défini comme une croissance de rattrapage accélérée, habituellement observée après une période de dénutrition. Le catch-up est caractérisé par une vitesse de croissance supérieure à la médiane pour un âge et un sexe donnés et se manifeste le plus souvent par une augmentation anormale de la masse adipeuse par rapport à la masse maigre (Saenger et al, 2007). De nombreuses études ont observé le phénomène de catch-up chez près de 90% des individus RCIU (Karlberg & Albertsson-Wikland, 1995).Le rattrapage de croissance survient pendant la vie infantile, généralement durant les deux premières années de vie. Cette croissance rapide a pour fonction de compenser la moindre croissance foetale, ce qui va permettre aux individus nés avec un faible poids de naissance de normaliser leur poids et leur taille d'une manière plus rapide et rétablir ainsi un bon état de santé à court terme.

Plusieurs études cherchent à déterminer les causes de cette augmentation rapide de la croissance(Ounsted et al, 1988). Cette augmentation excessive de la masse grasse est expliquée en partie par la conservation des mécanismes énergétiques, suite à la suppression de la thermogenèse mais également par la diminution de la satiété des enfants RCIU (Ounsted et al, 1988). Monteiro et al. (2005) ont montré que le rattrapage de croissance du poids et de la taille, chez les individus RCIU, est achevé à l'âge de 2 ans (Monteiro & Victora, 2005). Cependant, des études ont montré que ce processus peut aussi avoir lieu à n'importe quel stade de développement, par exemple entre 3 et 11 ans (Barker, 2004; Eriksson et al, 1999).Toutefois, il est évident que le rattrapage de croissance accélérée et précoce aggrave les conséquences métaboliques du RCIU. Ibanez et al. (2006) ont montré, chez des enfants âgés de 3-4 ans et présentant un catch-up avant l'âge de 2 ans, que la composition corporelle était

altérée, l'adiposité abdominale excessive et le développement de la masse maigre réduit (Ibanez et al, 2006).

Des travaux effectués sur un modèle rongeur, induisant un RCIU expérimentalement, ont montré que l'obésité spontanée n'était pas visible après le sevrage lorsque les animaux étaient nourris avec un régime standard. Cependant, lorsqu'ils étaient soumis à un régime hypercalorique, ils avaient tendance à être obèses (Vickers et al, 2000; Yura et al, 2005). Cette observation ne s'applique toutefois pas à tous les modèles animaux. En effet, un excès d'adiposité a été observé chez le porc né RCIU, à partir de l'âge de 12 mois, quel que soit le régime alimentaire (Poore & Fowden, 2003). Il est à noter que l'adipogenèse se déroule durant des périodes critiques dans la vie de l'individu: elle démarre durant la vie fœtale et se poursuit pendant la vie postnatale. De ce fait, l'adipogenèse semble être une cible clé de la programmation développementale. Ainsi, chez le RCIU, ceci pourrait s'expliquer soit par une altération au niveau du système hypothalamique qui joue un rôle primordial dans le contrôle de la prise alimentaire, soit par une dérégulation de la fonctionnalité du tissu adipeux. L'altération des deux fonctions est aussi possible chez les RCIU. En effet, les travaux de Attig et al. (2008) (Attig et al, 2008a) ont montré que le blocage de la leptine (hormone régulatrice de la prise alimentaire) chez le rat, par des antagonistes de la leptine, durant la vie postnatale, induit une altération de la prise alimentaire et de la régulation métabolique à long terme. Les animaux se trouvent donc plus sensibles à développer l'obésité (Attig et al, 2008b; Vaisse et al, 1996). Ces résultats montrent que la leptine a un effet sur le développement du nouveau-né. D'ailleurs, le traitement des nouveau-nés de faible poids de naissance par la leptine a permis de rectifier leur prise alimentaire ainsi que leur poids et leur adiposité à l'âge adulte (Vickers et al, 2008).

d) RCIU et pathologies intestinales : Focus sur le microbiote intestinal

i) Le microbiote intestinal

Définition et fonctions

Le microbiote intestinal est l'ensemble de la population bactérienne qui colonise notre tube digestif. Il est constitué d'environ 100 billions de cellules bactériennes au total, regroupées sous plus de 1000 espèces (Fehmann et al, 1997; Flint, 2012) soit 10 fois plus de cellules que les cellules humaines de tout l'organisme (Drusch, 1999). Les populations bactériennes dominantes demeurent relativement stables chez l'adulte sain (Zoetendal et al, 1998). La dominance est donc à partager entre deux phyla (Dore & Corthier, 2007).

- Le phylum des Firmicutes qui représente entre 50 à 80% du microbiote
- Le phylum des Bacterioidetes qui représente 10 à 40% du microbiote.

Bien que la composition du microbiote intestinal soit hautement conservée entre les individus, elle évolue sans cesse selon notre régime alimentaire, l'âge, le sexe, la corpulence, le mode de vie, le mode d'accouchement et l'allaitement. Chacun d'entre nous a son propre microbiote qui présente en quelque sorte notre signature bactérienne résultant d'une évolution conjointe entre lui et nous. Les deux tiers des bactéries intestinales sont propres à chacun de nous et le dernier tiers est commun) (Woodmansey, 2007)

Le microbiote intestinal, décrit par Prakash *et al.*, (2011), joue un rôle essentiel avec trois principales fonctions : métabolique, protectrice et structurale (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Prakash *et al.*, 2011).

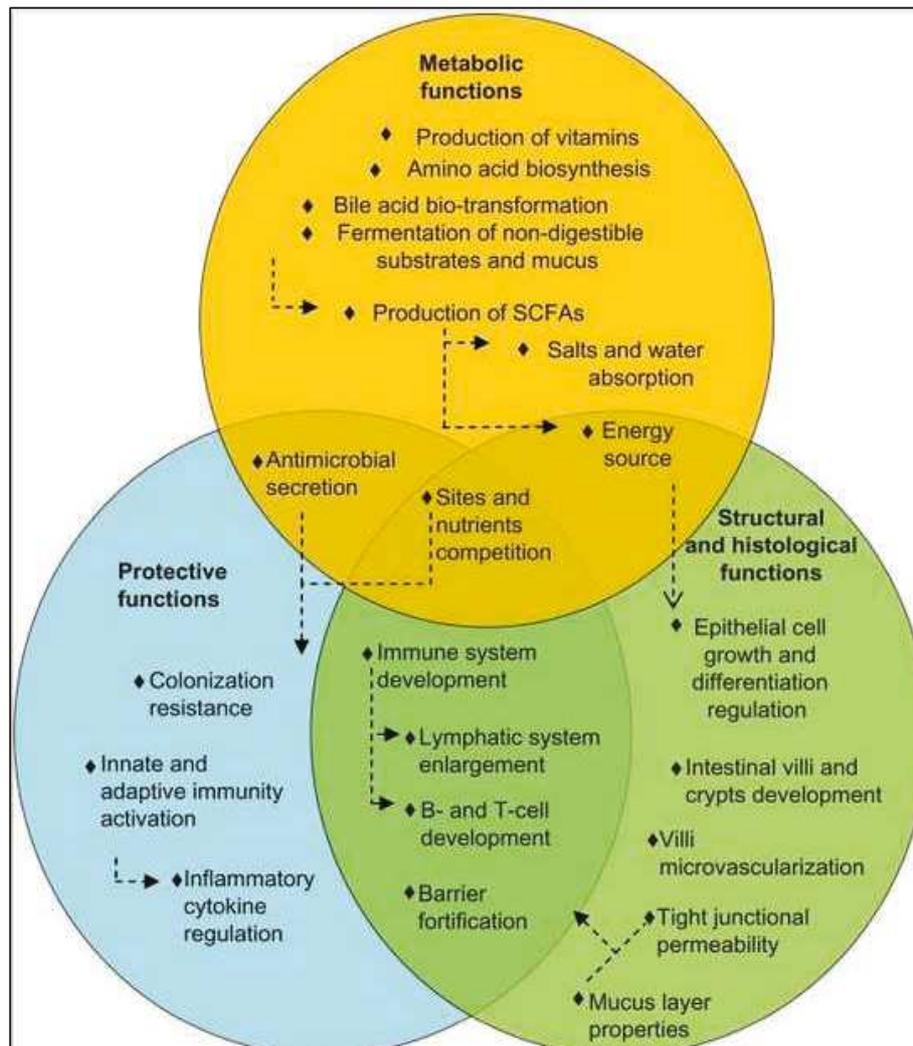


Figure 7 : Les fonctions majeures du microbiote intestinal (Prakash *et al.*, 2011)

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'équilibre du microbiote intestinal, notamment l'alimentation, le stress, les antibiotiques et le vieillissement. Une fois déséquilibré, le microbiote induit des problèmes de santé tels que l'obésité, la colite ulcéreuse, la maladie de Crohn, le cancer colorectal, le syndrome du côlon irritable, la maladie cœliaque ainsi que d'autres maladies (de Vos & de Vos, 2012; Flint, 2012).

Implantation du microbiote intestinal

En se basant sur le principe de la stérilité de l'environnement intra-utérin, le microbiote est considéré comme non-inné, c'est-à-dire acquis après la naissance. De ce fait, ce n'est qu'à partir de la naissance que l'implantation de la population bactérienne chez les nouveau-nés démarrerait très rapidement, via des bactéries de leur environnement (par contact avec le microbiote de la peau des adultes, l'alimentation, etc (Schwiertz et al, 2003). On ne parle d'un microbiote "adulte" qu'à partir de deux ans. Toutefois, l'étude de Jiménez et al.(2005) nie ce constat de stérilité en montrant (Jimenez et al, 2005), chez la souris en gestation, qu'un passage de bactéries commensales de la mère à sa progéniture *in utero*, via le cordon ombilical ou le liquide amniotique (Jimenez et al, 2008), est possible. De plus, la présence du microbiote dans le placenta a été révélée par les travaux récents d'Aagaard et al. (2014) menés sur une cohorte de 320 femmes. Cette étude a montré que le microbiote détecté est différent de celui de la peau et du tractus urogénital mais proche de la cavité buccale (Aagaard et al, 2014). Cependant, ce débat est à ce jour toujours controversé. Kliman H. J. (2014) soutient que l'approche analytique développée par Aagaard et al., basée uniquement sur une étude de l'ADN extrait sans une étude complémentaire de la viabilité microbienne, ne détecterait que de l'ADN de cellules mortes provenant de la cavité buccale maternelle et se retrouvant au niveau du placenta par le biais de la circulation sanguine (Kliman, 2014).

Des données disponibles à ce jour suggèrent que les premiers jours de la vie constitueraient une période clé pour l'implantation des premières bactéries. En effet, la population bactérienne implantée dans le tube digestif, quelques jours après la naissance, est dépendante du mode d'accouchement (flores fécale, vaginale et buccale de la mère), ainsi que de l'environnement (air, peau) (Lees et al, 2014).

Le rôle de l'environnement, et en particulier l'alimentation postnatale, semble être très important dans le développement du microbiote. La Figure 8 résume les impacts bénéfiques et délétères de l'environnement externe sur la modulation du microbiote intestinal de l'enfant.

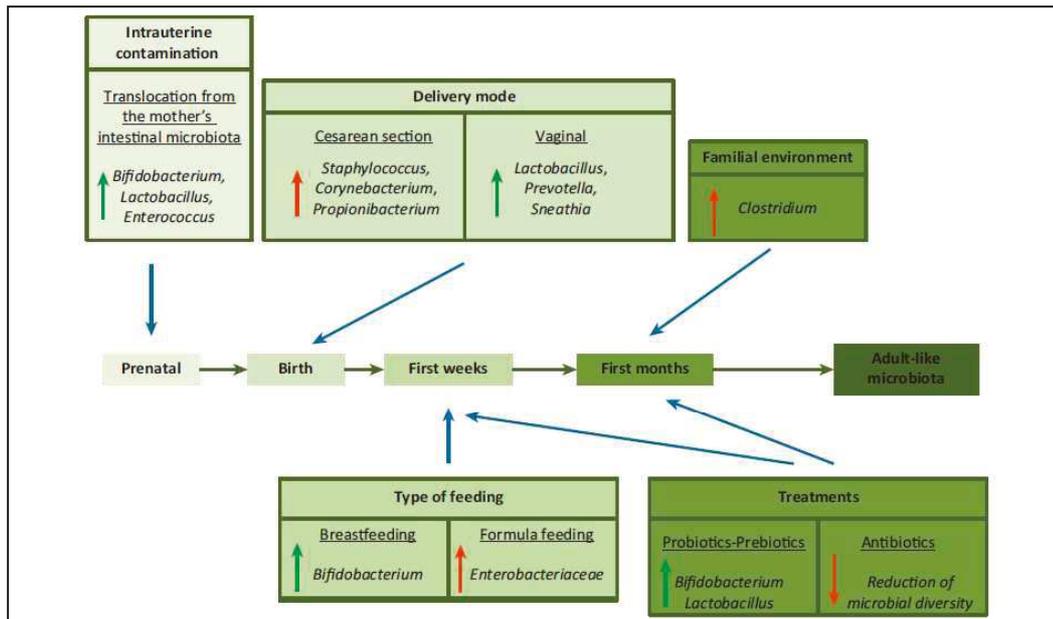


Figure 8 : Effets des facteurs externes sur le microbiote intestinal de l'enfant. Les flèches vertes montrent les modifications bénéfiques ; flèches rouges montrent les modifications comme négatives pour un développement sain (Matamoros et al, 2013)

Différentes études menées par Schwartz et al. (2003) sur des nouveau-nés ont montré que les profils bactériens, relativement simples à la naissance, présentent une complexité croissante au cours du temps. Dans ce sens, le lait (maternel et/ou infantile), qui représente la première source d'alimentation pour les bébés et la première matrice «étrangère» qui traverse le tractus digestif, constitue un élément majeur dans ce processus (Lees et al, 2014).

Avec la diversification alimentaire, la flore se modifie, induisant une diversification des populations bactériennes (

Figure 9). Même si plusieurs travaux ont été effectués sur le microbiote intestinal des bébés et des adultes, la totalité de la population bactérienne touchée reste encore mal connue.

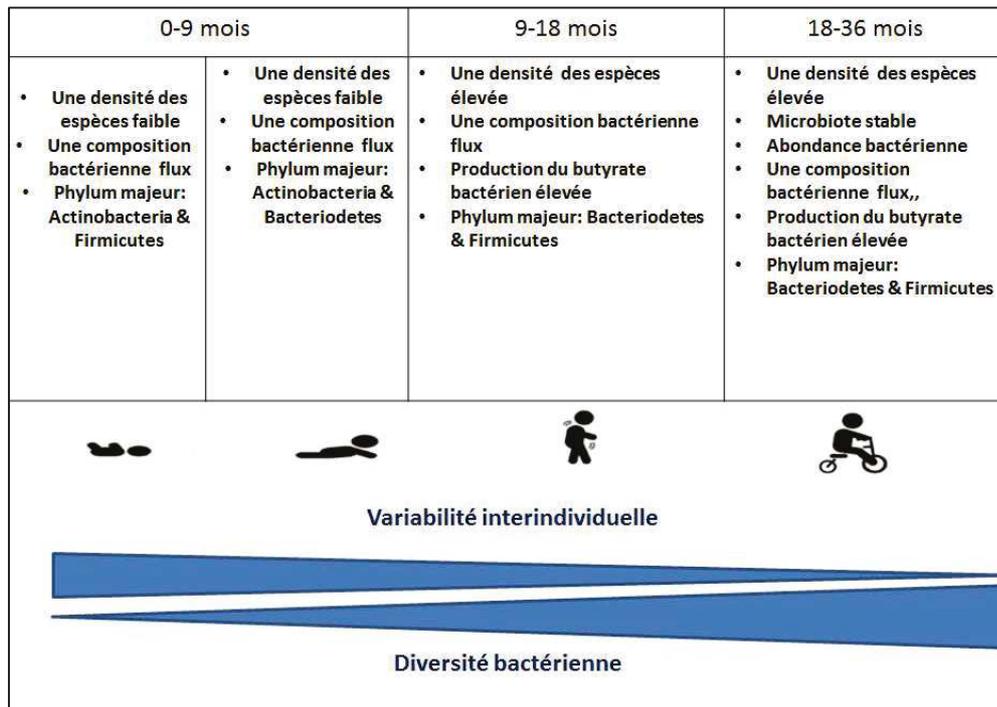


Figure 9 : Microflore intestinale de l'enfant : évolution en fonction de l'âge (Adapté de (Arrieta et al, 2014 ; Voreades et al, 2014))

ii) Modulation du microbiote chez les RCIU et pathologies intestinales

En ce qui concerne le RCIU et les pathologies intestinales, peu d'observations ont été effectuées mais les premiers résultats ouvrent des perspectives intéressantes. Ainsi, le faible poids de naissance semble représenter un facteur de risque pour la survenue des pathologies intestinales pendant la vie postnatale, comme l'entérocolique ulcéro-nécrosante. En effet, Fança-Berthon P. et al. (2010) ont montré, dans un modèle rongeur RCIU, une altération des fonctions intestinales (prolifération, absorption, digestion) qui, en modifiant l'environnement intestinal, induirait la modulation du microbiote au cours de la période postnatale (Fança-Berthon et al, 2010). De plus, chez des porcelets, D'Inca R et al. (2011) ont montré que les RCIU présentaient des signes d'immaturation digestive précoce. Durant la période postnatale, la colonisation bactérienne et l'adaptation intestinale sont altérées (D'Inca et al, 2011). De même, toujours chez le porc, des études récentes ont mis en évidence une altération structurale de l'intestin grêle qui se manifeste par une taille réduite des villosités, limitant ainsi la surface d'absorption intestinale qui pourrait être due à un taux élevé de l'apoptose

dans l'épithélium intestinal; (D'Inca et al, 2011). Ceci joue un rôle primordial dans la modulation de la colonisation bactérienne. Michiels et al. (2013) ont également rapporté un mauvais développement du système digestif des porcelets RCIU pendant la période post-sevrage (Michiels et al, 2013).

Fança-Berthon P et al. (2009) ont aussi montré, chez des rats soumis à une restriction protéique pendant la gestation, que le RCIU est associé à une réduction de la profondeur des cryptes au niveau du côlon. De plus, le peptide trifolié TFF3 et les glycoprotéines mucines sécrétées par les cellules épithéliales de surface et contribuant activement à la protection de l'épithélium, présentent des niveaux d'expression réduits dans la muqueuse du côlon des rats RCIU par rapport aux témoins. Ceci confirme que le faible poids de naissance nuit au développement de la barrière intestinale. L'absence d'une barrière efficace du côlon, induite par le RCIU, peut prédisposer à une lésion colique, non seulement dans la vie du nouveau-né mais aussi plus tard (Fança-Berthon et al, 2010).

e) Implication du Stress oxydant dans la pathologie du RCIU

Le stress oxydant se caractérise par une déstabilisation de la balance pro-oxydants/anti-oxydants. Les radicaux libres ERO ou ROS (reactive oxygen species), comme le H₂O₂, sont des composés capables d'oxyder plusieurs molécules cellulaires ou extracellulaires et d'altérer l'expression d'un grand nombre de gènes. Cependant, les cellules de l'organisme expriment des molécules ayant un pouvoir anti-oxydant, les protégeant ainsi contre les effets délétères de la production excessive des ERO. Face à l'oxydation, différents systèmes anti-oxydants endogènes peuvent être activés comme la superoxyde dismutase (SOD) la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) des protéines de transport des métaux (telles que la ferritine), des substances endogènes comme le glutathion (GSH) ou encore la thiorédoxine-1, système de défense non-enzymatique (Mahmood et al, 2013). Via l'alimentation, plusieurs molécules exogènes protectrices semblent jouer un rôle de défense important: elles sont représentées par les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et les oligo-éléments (comme le Zn ou le Se) Figure 10).

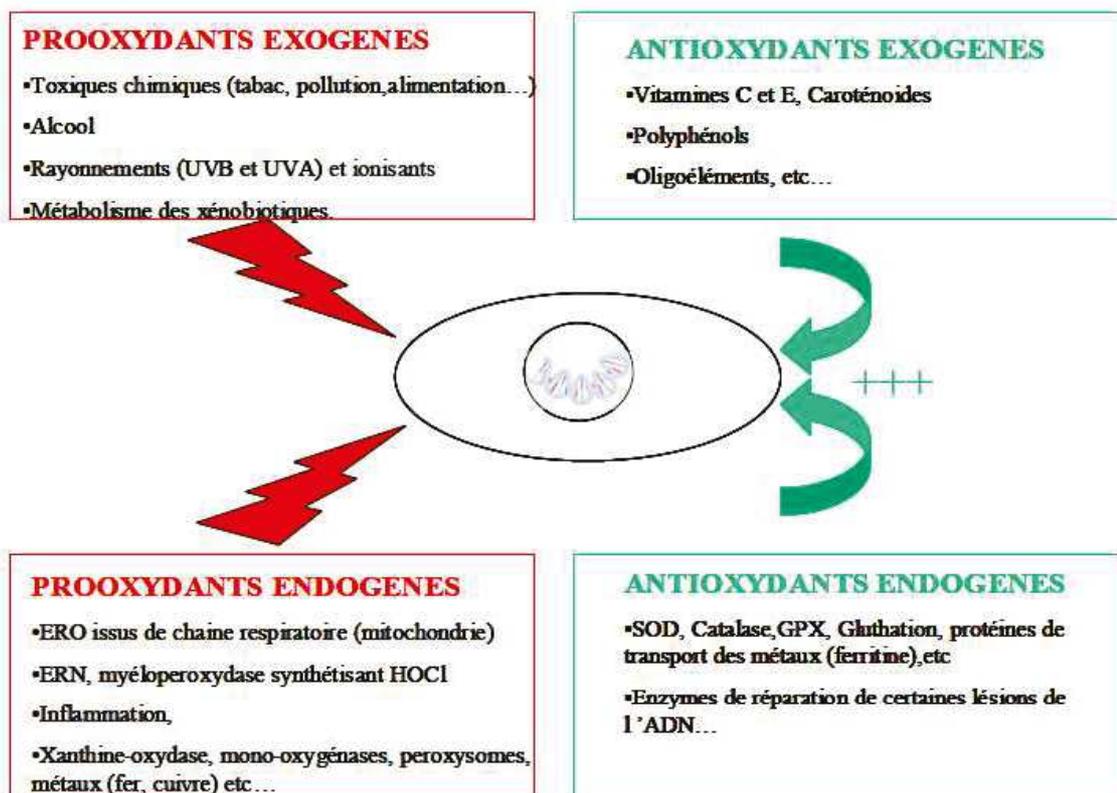


Figure 10: Principaux systèmes prooxydants et anti-oxydants (Daum-Badouard, 2004)

De nombreuses études ont rapporté l'effet du stress oxydant sur l'altération de la croissance fœtale induisant des risques importants de développement du syndrome métabolique à long terme (Luo et al, 2006; Thompson & Al-Hasan, 2012). L'état nutritif appauvri de la mère pendant la grossesse, est généralement à l'origine de l'installation d'un état pro-oxydant. En effet, (Willcox et al, 2004) ont montré qu'une carence protéique inhibe la synthèse des antioxydants tels que le glutathion. De même, le déficit en vitamines A, C et E qui jouent un rôle de défense antioxydant, stimule la mise en place d'un stress oxydant. L'analyse du sang du cordon, chez des nouveau-nés RCIU humains, a permis de mettre en évidence la présence de taux importants de MDA (connues pour leurs propriétés oxydantes), associée à une réduction de trois puissants agents antioxydants : la CAT, la SOD et la GPX (Gupta et al, 2007). L'étude menée par (Baydas et al, 2002) confirme les résultats précédents en montrant la présence d'un faible taux des vitamines anti-oxydantes chez les individus nés RCIU.

Chez le rongeur RCIU induit par ligature des artères utérines, il a également été démontré qu'une altération du milieu métabolique intra-utérin s'accompagne d'un

dysfonctionnement mitochondrial et de l'installation d'un stress oxydant accru au niveau du pancréas, du muscle et du foie (Ndisang et al, 2008; Simmons et al, 2001).

D'autre part, des rats RCIU ont présenté, dès l'âge de 3 et 6 mois, des modulations de leur métabolisme glucidique qui se traduit par une perturbation de la phosphorylation oxydative, de la néoglucogenèse (Ndisang et al, 2008; Simmons et al, 2001), de l'activité de la pyruvate déshydrogénase directement liée à une élévation de l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase-4. L'ensemble conduit à des niveaux basaux de glucose hépatique plus élevés. De plus, une surexpression hépatique de la PEPCK pourrait, à elle seule, conduire à une augmentation de la production de glucose.

Dans les conditions d'un rattrapage accéléré de croissance («catch-up growth», voir page 43) chez le RCIU, le stockage élevé de nutriments et d'énergie au niveau de plusieurs organes s'accompagne d'un réarrangement mitochondrial et d'une augmentation importante du stress oxydant (Simmons, 2006). De plus, une étude toute récente de Che L. (2015) rapporte que, chez des individus RCIU, le stress oxydant joue un rôle important dans l'induction du syndrome métabolique due essentiellement à la déficience du système de défense anti-oxydant (Che et al, 2015). Dans des conditions d'hypoxie placentaire (grossesse avec RCIU), la baisse d'oxygène, associée à la synthèse des ERO et des ERN, affecte la fonction des protéines placentaires ainsi que les voies métaboliques (Myatt, 2006). De nombreuses études ont montré une augmentation des cytokines inflammatoires dans le placenta d'enfants nés avec un RCIU, une perturbation de l'angiogenèse et une diminution de l'expression de facteurs de croissance (Gauster et al, 2007; Jarvenpaa et al, 2007; Street et al, 2006).

I.2 Importance de la nutrition post-natale précoce : la lactation

Pendant la période de grossesse, la nutrition constitue un facteur clé pour le bon développement du fœtus (Phillips, 2006). Une fois le retard de croissance intra-utérin diagnostiqué, un meilleur accès aux soins, un suivi de grossesse et de l'état nutritionnel des mères et enfin une prise en charge des nouveau-nés sont nécessaires pour augmenter les chances de survie. En effet, les mères doivent suivre un régime alimentaire adapté pour assurer un développement fœtal optimal. Ensuite, après l'accouchement et pendant les premiers jours et semaines de vie postnatale (lactation), il est impératif de maintenir les RCIU dans un environnement adéquat pour favoriser une croissance optimale à âge gestationnel équivalent.

La lactation constitue une période critique de développement postnatal de l'enfant et en particulier chez le RCIU. La maîtrise de la nutrition au cours de cette période permet en effet d'assurer une croissance optimale et harmonieuse chez l'enfant et de compenser le retard de croissance dû à la restriction alimentaire et/ou placentaire *in utero*.

I.2.1 Allaitement maternel

Pour assurer un développement optimal, le nourrisson requiert, pendant sa première année de vie, des besoins précis et particuliers. Ces besoins sont naturellement couverts par le lait maternel qui, par excellence, reste la source nutritionnelle de référence des nouveau-nés. Avec 60% d'allaitement maternel à la naissance, la France se situe parmi les pays avec le plus faible taux d'allaitement au niveau mondial (OCDE, 2011) Figure 11 (Figure 11).

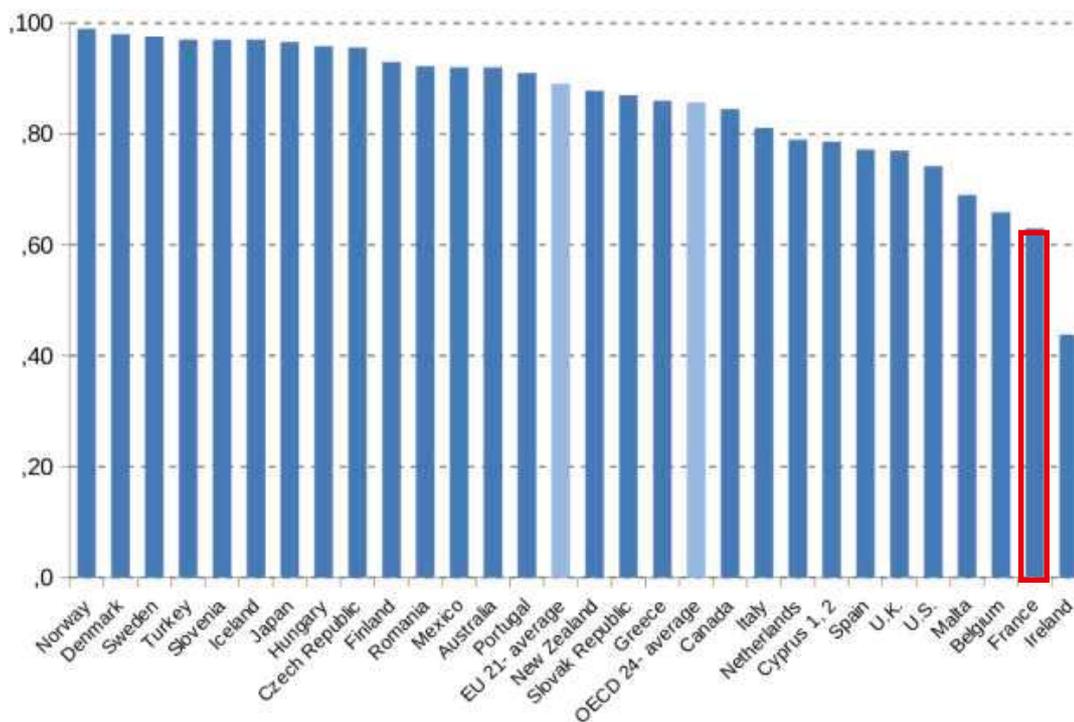


Figure 11 :Taux d'allaitement maternel selon la base de données de l'ODEC (OCDE, 2011)

a) Composition et évolution du lait maternel

i) Composition

De nombreuses études se sont intéressées à la composition du lait maternel, du fait de sa spécificité et de son évolution adaptative pour apporter les nutriments nécessaires à la croissance des nourrissons. Sa composition diversifiée (lipides, protéines, glucides, minéraux, anticorps et vitamines) lui confère de nombreuses propriétés biologiques.(Tableau 2 : Composition du lait maternel (FAO, 1998; Lebeuf Y., 2002)

Tableau 2 : Composition du lait maternel (FAO, 1998; Lebeuf Y., 2002)

	Lait Maternel
Protéines (g/100g)	
Caséines	0,6 (60%)
Protéines solubles	0,4 (40%)
α-lactalbumine	3,6
β-lactalbumine	Traces

Lactoferrine	1,5
Lysozyme	3,0
Glucides (g/L)	
Lactose	6,9
Oligosaccharides	0,6-11
Lipides (g/100g)	
Acide gras saturés	51-52
Acides gras mono-insaturés	29-30
Acides gras poly-insaturés	17-18
Minéraux (mg/100g)	
Calcium	32
Phosphore	14
Magnésium	3
Potassium	51

ii) *Évolution de la composition du lait*

En fonction de la croissance de l'enfant, le lait maternel évolue. On peut détecter trois phases: le colostrum, le lait de transition et le lait mature.

Le colostrum est le lait *post-partum* immédiat (de 0 à 5 jours). Il est composé d'un taux faible en lipides, lactose et caséine par comparaison avec le lait mature. L'apport énergétique est faible (450 à 480 kcal/litre contre 650 à 700 kcal/litre). Le colostrum joue un rôle important dans la protection initiale du nouveau-né du fait de son abondance en cellules immunocompétentes (10 fois plus que le lait mature), en protéines solubles (deux fois plus riches) et en oligosaccharides (deux fois plus) (Cabanelas et al, 2006; Chaturvedi et al, 2001). Quand il s'agit d'un accouchement prématuré, la période colostrale est prolongée. Ainsi, afin d'assurer une maturation cérébrale correcte du nouveau-né, le colostrum se trouve enrichi en acides gras polyinsaturés. Du 5^{ème} au 12^{ème} jour, la composition du lait évolue progressivement, on parle donc d'un **lait de transition**. La concentration en protéines solubles est réduite en faveur d'une augmentation du taux de lactose, lipides et caséines. Au-delà du 14^{ème} jour, en fonction des besoins nutritionnels de l'enfant, le lait continue à évoluer et devient **mature** (Bauer & Gerss, 2011). Sa composition est celle décrite dans le Tableau 2.

b) Les bénéfices de l'allaitement maternel à court et à long termes

Nombreuses sont les études qui ont montré que la mortalité infantile est beaucoup plus faible chez les enfants nourris au sein que chez ceux recevant une préparation pour nourrissons. En effet, l'allaitement durant 6 mois complets réduit, de façon significative, le risque de diarrhée aiguë durant la première année de vie par rapport à un allaitement durant 3

mois. Il s'avère également qu'un allaitement de 3 mois diminue le risque de dermatite atopique et ce en particulier chez les enfants à risque. Il pourrait aussi diminuer le risque d'asthme. De plus, l'effet préventif du lait maternel sur les manifestations allergiques semble dépendre du régime alimentaire de la mère. Le risque d'obésité est également d'autant plus faible que l'allaitement est prolongé. En effet, plusieurs études ont montré que les enfants nourris au biberon dès l'âge de 3 mois ont un IMC plus élevé et présentent des plis cutanés plus épais que les enfants nourris au sein. L'allaitement artificiel semble favoriser un rebond de corpulence plus précoce dont on connaît le caractère prédictif sur l'obésité ultérieure. Enfin, l'allaitement, via sa composition parfaitement adaptée aux besoins du nouveau-né mais aussi par la présence de différents biofacteurs tels que l'hormone de croissance, la leptine, l'insuline, l'adiponectine et d'autres encore, pourrait être en grande partie responsable de la meilleure gestion des apports alimentaires en favorisant la mise en place de mécanismes neuronaux de régulation dès le plus jeune âge.

I.2.2 Allaitement artificiel : Définition et composition des formules infantiles

Le lait de vache constitue la base principale des préparations infantiles. Certaines modifications sont apportées à ce lait afin qu'il soit plus digeste et se rapproche le plus du lait maternel (lait de référence). Le Tableau 3 résume les différences de composition entre les deux types de lait.

a) Composition du lait maternel versus le lait de vache

De nombreuses différences de composition existent entre le lait de vache et le lait maternel comme le montre le Tableau 3 (FAO, 1998; Lebeuf Y., 2002).

Tableau 3: Comparaison de la composition du lait humain et du lait de vache

	Lait maternel	Lait de vache
Protéines (g/100g)		
Caséines	0,6 (60%)	2,7(82%)
Protéines solubles	0,4 (40%)	0,6 (18%)
α - lactalbumine	3,6	2,7

β -lactalbumine	<i>Traces</i>	1,5
Lactoferrine	1,5	<i>Traces</i>
Lysozyme	3,0	<i>Traces</i>
Glucides (g/L)		
Lactose	6,9	4,7
Oligosaccharides	0,6-11	-
Lipides (g/100g)		
Acide gras saturés	51-52	67-68
Acides gras mono-insaturés	29-30	24-25
Acides gras poly-insaturés	17-18	4-5
Minéraux (mg/100g)		
Calcium	32	119
Phosphore	14	93
Magnésium	3	13
Potassium	51	152

Le lait de vache est nettement plus riche en protéines que le lait maternel. La répartition des protéines solubles et insolubles est également différente : dans le lait de vache, il existe une forte prédominance en caséines (82%) comparativement aux protéines solubles (18%), alors que le lait maternel présente une répartition plus équilibrée entre ces deux fractions avec 60% de caséines et 40% de protéines solubles (Lebeuf Y., 2002).

L' α -lactalbumine est présente dans les deux laits et sa concentration est plus forte dans le lait maternel. Absente dans le lait maternel, la β -lactalbumine représente l'une des principales protéines solubles du lait de vache ; elle présente, par ailleurs, un potentiel allergisant pour le nouveau-né (Pischetsrieder & Henle, 2012).

Bien que le lait maternel soit moins riche en protéines que le lait de vache, sa qualité nutritive, déterminée par l'indice chimique des protéines (rapport entre la quantité d'acides aminés essentiels et la quantité totale des acides aminés) est nettement supérieure à celle du lait de vache. Cet indice est de 100 pour le lait maternel contre 70 pour le lait de vache.

Une comparaison des acides aminés de ces deux laits est présentée dans le

Tableau 4 (ARSAN A., 2011; ISPED., 2013).

Tableau 4 : Comparaison de la composition en acides aminés du lait maternel et du lait de vache

Acide aminé indispensable (mg)	Lait maternel (pour 100ml)	Lait de vache (pour 100 ml)
Isoleucine	68	228
Leucine	100	350
Lysine	73	277
Méthionine	25	88
Phénylalanine	48	172
Thréonine	50	164
Tryptophane	18	49
Valine	70	245
Acide aminé semi-indispensable (mg)	Lait maternel (pour 100ml)	Lait de vache (pour 100 ml)
Histidine	22	95
Arginine	43	123
Acide aminé non indispensable (mg)	Lait maternel (pour 100ml)	Lait de vache (pour 100 ml)
Alanine	39	117
Aspartate	99	257
Cystéine	22	31
Glutamate	199	708
Glycine	24	71
Proline	22	95
Sérine	49	184
Taurine	8	0,1
Tyrosine	49	163

Comme le montre ce tableau, le lait maternel contient des teneurs plus faibles en phénylalanine et tyrosine (acides aminés aromatiques) que le lait de vache. Par ailleurs, le lait maternel est riche en taurine (10 fois plus que dans le lait de vache), acide aminé intervenant dans le développement cérébral.

Le lactose représente le sucre majoritaire dans les deux laits, avec des teneurs plus faibles dans le lait de vache que dans le lait maternel (4,7 g/L contre 6,9 g/L). Quant aux oligosaccharides, ils sont uniquement présents dans le lait maternel.

Bien que les teneurs en lipides des deux laits soient assez proches, environ 3,5 g pour 100 ml, leurs profils d'acides gras diffèrent notablement ; comme le montre le Tableau 5, les teneurs en acides gras insaturés sont supérieures dans le lait maternel, contrairement aux teneurs en acides gras saturés, supérieures dans le lait de vache.

Tableau 5 : Comparaison qualitative des lipides du lait de vache et du lait maternel (Vermeil et al, 2003)

	Lait maternel (%)	Lait de vache (%)
Acides gras saturés	51-52	67-68
Acides gras mono-insaturés	29-30	24-25
Acides gras poly-insaturés	17-18	4-5
Rapport acides gras saturés/acides gras insaturés	1	>2

Enfin, le lait de vache contient des teneurs très élevées en minéraux comme le calcium, le phosphore, le magnésium et le potassium. A l'inverse, il contient moins de fer que le lait maternel. (FAO., consulté le 2 novembre 2013).

L'apport vitaminique du lait de vache est quelque peu différent de celui du lait de femme. Le lait de femme contient plus de vitamines A, E, PP (B3) et C que le lait de vache, à l'exception des vitamines D, K et les autres du groupe B dont les teneurs sont plus élevées dans le lait de vache. Sur le plan hormonal et la composition enzymatique, des différences majeures résident entre les deux types de lait.

La composition du lait de vache n'est pas adaptée à l'alimentation du nouveau-né dont la référence est le lait maternel. Il doit donc subir divers traitements pour améliorer sa qualité nutritionnelle.

b) Les formules infantiles

Les formules infantiles sont des denrées alimentaires destinées à l'alimentation des nourrissons pendant les premiers mois de leur vie et élaborées avec une composition

spécialement conçue pour répondre à leurs besoins nutritionnels particuliers jusqu'à l'introduction d'une alimentation complémentaire appropriée. L'élaboration des formules infantiles est réglementée dans le but de préserver au mieux la santé de l'enfant : ces préparations doivent répondre à des normes fixées par arrêtés ministériels et publiées dans les Journaux Officiels de la République Française et de l'Union Européenne. Leur composition est définie par la directive 2006/141/CE du 22 décembre 2006, transcrite en droit français par l'arrêté du 11 avril 2008. Il faut distinguer les préparations pour nourrisson des préparations de suite.

1. **Les préparations pour nourrissons (formules premier âge)**, de 0 à 6 mois, correspondent à l'étape où le nourrisson s'alimente exclusivement de lait. Les formules infantiles de cette étape tentent à imiter le lait maternel. Ces préparations à base de lait de vache contiennent plus de protéines que le lait maternel. Pour corriger la proportion trop importante de caséine, le lait de vache est enrichi en protéines solubles par ajout de lactosérum. De même, pour réduire le caractère allergénique du lait de vache par la présence de β lactoglobuline, une hydrolyse enzymatique des protéines sériques peut être envisagée (MAHAUT Michel, 2000). Le lait de vache est plus riche en sels minéraux que le lait maternel. Pour limiter la teneur en sels minéraux des formules infantiles ou enrichir le lait de vache en composants n'apportant pas ou peu de sels minéraux, les industriels procèdent à une déminéralisation par électrodialyse et nanofiltration sur membrane, des protéines solubles du lactosérum, ces dernières possédant une fraction minérale importante. Pour ces laits, une supplémentation en vitamine D et un ajustement de la teneur en acides gras insaturés sont également appliqués (Isabelle., 2001).
2. **Les préparations de suite (Formules deuxième âge)**, de 6 à 12 mois, correspondent à l'étape de diversification alimentaire : les besoins nutritionnels de l'enfant changent et la composition des formules est adaptée à ce changement. En plus de l'ajustement du rapport protéique caséines/protéines solubles et des minéraux, une attention particulière est apportée à l'apport en fer et en acides gras essentiels.
3. **Les Formules du troisième âge dites de croissance**, de 12 à 36 mois, correspondent à la période de diversification et de sevrage. Pour ces laits, l'apport en fer et en acides gras essentiels est particulièrement contrôlé.

c) Les procédés de fabrication des formules infantiles

La fabrication du lait se traduit par l'utilisation de composants d'origine lactique (lait de vache, crème et lactosérum déminéralisé) et de composants d'origine non lactique (matières grasses végétales, sels minéraux, vitamines et glucides dont le lactose, le saccharose et la maltodextrine).

- **Les prétraitements du lait de vache** : le lait de vache destiné au prétraitement subit une batterie de tests afin de contrôler l'absence d'antibiotiques et de déterminer sa composition en matières grasses. Ensuite, il est acheminé vers les entreprises de traitement où il subit une pasteurisation visant à garantir une stabilité microbiologique. Cette étape consiste à chauffer la formule lactée à 73°C pendant 16 secondes puis à le refroidir rapidement. Cette étape permet la suppression totale des germes pathogènes. Ce premier traitement thermique induit la destruction de la vitamine C. Le lait est ensuite mélangé à des ingrédients lactiques et non lactiques apportés en quantités adéquates ; cette étape est réalisée en phase liquide de manière à reconstituer la formule lactée souhaitée. Le lait est ensuite homogénéisé pour faciliter la dispersion de la matière grasse et stabiliser le mélange.
- **L'homogénéisation** : au cours de l'homogénéisation, les globules graisseux sont éclatés en fines particules qui se répartissent ainsi de manière homogène dans la phase aqueuse du lait. Pour ce faire, la formule lactée est chauffée et passe à travers une buse sous une pression allant de 100 à 250 bars. Les barèmes de température et de pression sont définis de manière à diminuer le diamètre des globules gras qui passe d'environ 3-6 µm à un diamètre moyen de 1 µm. Cette réduction facilite la digestion.
- **La concentration** : la formule lactée est par la suite concentrée afin de diminuer la teneur en eau de la préparation qui passe de 90% à 50% après concentration. La formule a alors un aspect visqueux.

L'atomisation la formule lactée est ensuite déshydratée dans une chambre de séchage où elle se trouve atomisée. Le flux d'atomisation est réalisé au moyen de buses «haute pression» ou de turbines de pulvérisation qui expulsent le mélange à une vitesse de 70 m/s. La goutte issue de la pulvérisation est mise en contact avec un air filtré et injecté à plus de 200°C. La goutte est ainsi transformée en poudre contenant moins de 4% d'humidité. Pour obtenir une formule lactée facilement soluble, la déshydratation ne doit pas être totale : l'humidité résiduelle permet ainsi la formation de granulés poreux. Ces techniques associant une forte pression et une forte température semblent agressives pour des structures «fragiles» telles que les protéines.

-
- **Le séchage à lit fluidisé:** le produit est alors transporté vers un appareil à lit fluidisé où les particules se déposent sur une plaque vibrante perforée afin de procéder à leur séchage. Enfin, cette poudre de faible masse volumique est refroidie avant de procéder à son conditionnement. A chaque étape de la fabrication, des prélèvements d'échantillons de la préparation sont effectués afin de détecter l'éventuelle présence de germes.

d) Impact des traitements thermiques sur la qualité nutritionnelle du lait

Le traitement thermique modifie les présentations physiques du lait, ses qualités organoleptique et nutritionnelle (Frangne & Adrian, 1972). Les avantages qui en résultent semblent être plus importants que les dommages qu'ils induisent ;c'est le cas des dérivés céréaliers (croûte de pain, biscuits, biscottes) dont la valeur commerciale est augmentée par un brunissement et un arôme appétent. Cependant, pour les produits laitiers, en raison de leurs teneurs élevées en lactose et en protéines, l'impact de la chaleur appliquée pendant la transformation n'est pas sans conséquence sur la qualité nutritionnelle(Friedman, 1996).

En effet, le traitement induit des modifications importantes des protéines, ce qui entraîne une modulation de la biodisponibilité des acides aminés qui les composent. La modification des acides aminés essentiels pour l'organisme entraîne une baisse de la digestibilité des protéines (Rerat et al, 2002).Ces auteurs ont montré, chez le porc, qu'une ingestion des protéines modifiées par la réaction de Maillard affectait la digestibilité de la lysine mais également celle d'autres acides aminés tels que la phénylalanine, la cystéine, l'acide aspartique et la glycine (Rerat et al, 2002). Chez l'homme, une étude clinique menée sur des adolescents âgés de 11 à 14 ans a révélé que la consommation d'aliments riches en produits de la réaction de Maillard induit une altération de la digestibilité des protéines (Seiquer et al, 2006). De plus, Finot et al. (2005b) ont observé que la digestibilité des hydrolysats de protéines modifiés par la réaction de Maillard, dans le cas d'une nutrition pédiatrique et clinique, est faible.

Selon les études de Mauron et al.(1990), la lysine est souvent le premier acide aminé affecté par la réaction de Maillard, du fait qu'il soit fortement réactif mais aussi parce qu'il est le premier ou le second acide aminé limitant dans la plupart des denrées alimentaires(Mauron, 1990).

Si l'effet du chauffage sur la composition protéique du lait est très remarquable, son action sur la matière grasse reste faible. En effet, la pasteurisation ne semble pas modifier les acides gras polyinsaturés, ce qui explique la stabilité de l'acide linoléique. Sa dégradation ne se fait qu'après un chauffage intense (180°C pendant une heure). Cependant, au cours du traitement thermique, une diminution légère du taux des acides gras essentiels est détectée dans les laits UHT et stérilisés. Il est également à noter que pendant une longue période de stockage, à des températures élevées, plusieurs produits se forment dans le lait : on citera les aldéhydes, les cétones et des substances réductrices.

e) Focus sur les laits destinés aux enfants à risque

Parallèlement aux laits de base donnés aux nourrissons en bonne santé, cinq catégories de laits particuliers adaptés aux nourrissons à risque ont été développés par les industriels. On distingue :

- Les laits Hypoallergéniques (HA) (KCM Frank Kneepkens, 5 Fev 2010) : comme son nom l'indique, il s'agit d'une hydrolyse partielle de la caséine ou des protéines solubles du lait de vache jusqu'à des peptides qui ne devraient pas dépasser 5000 kDa.
- Les laits à allégation, tels que les laits Anti Régurgitation (AR), confort, transit ou satiété.
- Les laits destinés à modifier la flore intestinale par acidification ou par ajout de prébiotiques.
- Les laits enrichis en Acides Gras PolyInsaturés (AGPI).
- **Les préparations pour nourrissons de faible poids à la naissance** : il existe des préparations lactées spéciales pour les enfants nés RCIU, induisant une croissance rapide dans le but de rattraper le faible poids de naissance. Ces préparations sont utilisées jusqu'à ce que l'enfant atteigne 3 Kg. Elles sont prescrites sur avis médical. Afin de répondre aux besoins de ces nourrissons, ces préparations doivent apporter :
 - des protéines dont la teneur doit être comprise entre 2 et 2,3 g pour 100 ml
 - un rapport caséines/protéines solubles faible (inférieur à 1)
 - dans l'apport lipidique, ces préparations doivent être riches en triglycérides à chaîne moyenne et en acides gras indispensables polyinsaturés à longue chaîne
 - un sucrage mixte formé de lactose et de dextrine-maltose
 - un enrichissement en fer, acide folique (B9), vitamine E et vitamine K pour lutter contre l'anémie du prématuré (antihémorragique).

Bien que ces préparations lactées contiennent un apport élevé en protéines, elles sont indispensables pour que les nourrissons compensent la moindre croissance fœtale et normalisent leur poids et leur taille d'une manière plus rapide. Toutefois, cet excès protéique pourrait avoir des conséquences néfastes sur la santé des enfants de faible poids aussi bien à court qu'à long terme. Une étude récente (Koletzko et al, 2009), menée sur 1678 enfants européens, a permis de révéler l'impact d'une alimentation lactée sur la taille et le poids des enfants allaités et nourris aux formules infantiles hypo et hyperprotéiques. Ces nourrissons ont été suivis jusqu'à l'âge de 24 mois. L'apport en protéines pendant la petite enfance a été associé à un «catch up growth» précoce à 2 ans. Cette croissance accélérée pourrait aggraver les conséquences métaboliques et induire le développement de pathologies à l'âge adulte telles que l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (Eriksson et al, 2000; Leon et al, 2000), l'obésité et l'insulinorésistance (Chomtho et al, 2008; Cianfarani et al, 1999; Ong, 2006). Ainsi la réduction du taux des protéines pendant l'enfance pourrait contribuer à la diminution du risque de surpoids et de l'obésité ultérieurement.

f) Bénéfice santé du lait maternel versus le lait infantile

Le lait maternel constitue une barrière protectrice du tube digestif. C'est grâce aux bactéries viables (*Bifidobacterium*) du lait que le système immunitaire du bébé pourrait être protégé. De plus, l'importance du lait est due à la présence (naturelle ou ajoutée) de composants non digestibles ayant un effet bénéfique sur l'hôte qu'on nomme prébiotiques, en particulier l'insuline (Gibson & Roberfroid, 1995). Les prébiotiques, en permettant la croissance de populations bénéfiques dominées par les bifidobactéries, favorisent, chez l'enfant nourri au lait artificiel supplémenté en prébiotiques, l'implantation d'un microbiote intestinal plus proche de celui des enfants allaités, accroissant ainsi le bénéfice santé pour l'enfant (Lees et al, 2014). De plus, il est à noter que la concentration de bifidobactéries dans l'intestin est augmentée suite à la fermentation du lactose non digéré. À ce titre, le lactose pourrait donc avoir des propriétés prébiotiques (Roberfroid, 2007).

Au-delà du premier mois de vie, les nourrissons allaités et ceux nourris avec des formules infantiles présentent des compositions des flores fécales différentes. En effet, la flore des premiers est peu diversifiée et formée en grande partie de bifidobactéries tandis que la flore des seconds est plus hétérogène et constituée essentiellement des *Bacteroides*, *Clostridia* et des entérobactéries (Dore & Corthier, 2007).

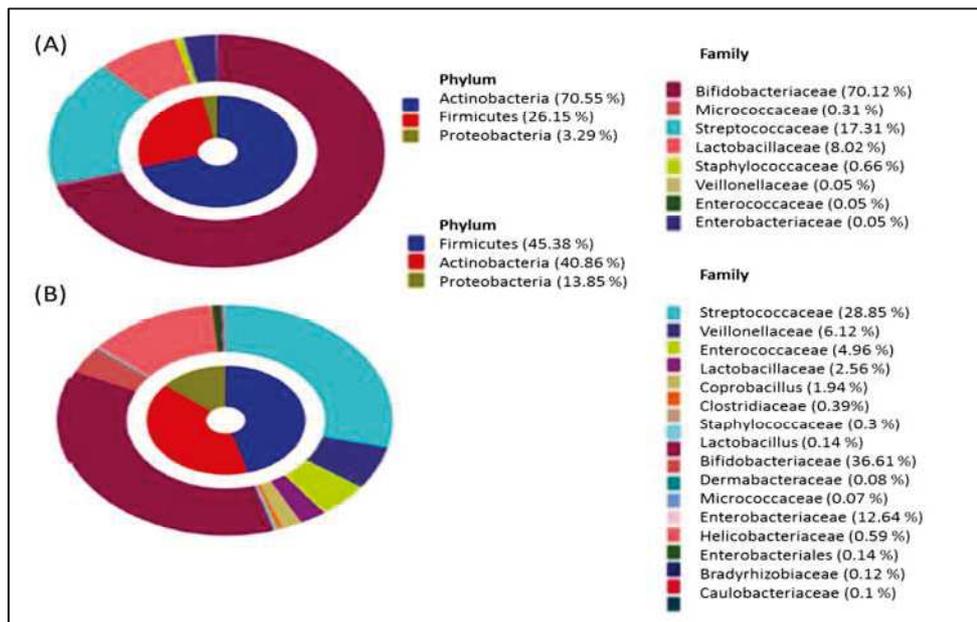


Figure 12 : Composition bactérienne des fèces humaines chez des nourrissons âgés de 4 semaines en fonction de la nature du lait (A) les nourrissons allaités, (B) nourrissons nourris au lait maternisé (Lee et al, 2015b).

De plus, l'allaitement maternel exclusif pendant au moins 4 mois mais idéalement 6 mois, est crucial pour prévenir au maximum les enfants des infections bactériennes et virales. Nombreuses sont les études qui ont montré que la mortalité infantile est beaucoup plus faible chez les enfants nourris au sein que chez ceux recevant une préparation pour nourrissons PD (LANCET, 2000; Scariati et al, 1997) (Groupe d'étude de l'OMS sur le rôle de l'allaitement maternel sur la prévention de la mortalité infantile).

En effet, l'allaitement complet durant 6 mois réduit, de façon significative, le risque de diarrhée aiguë durant la première année de vie par rapport à un allaitement de 3 mois.

De ce fait, on conclut que l'effet de l'allaitement partiel a modifié la capacité de prévention du lait maternel. En absence d'allaitement maternel, l'incidence d'obésité pendant l'enfance et l'adolescence semble être beaucoup plus importante. L'allaitement artificiel semble favoriser un rebond de corpulence plus précoce dont on connaît le caractère prédictif sur l'obésité ultérieure (Rolland-Cachera et al, 1995).

Les raisons d'un tel effet protecteur pourraient tenir à plusieurs raisons. En effet, l'apport protéique chez les enfants allaités au biberon est plus important en comparaison aux enfants allaités au sein. Il est clair que l'apport protéique chez les nourrissons doit être largement suffisant pour recouvrir les besoins de maintenance infantile et aussi assurer une croissance normale. Il faut

également prendre en considération la quantité stable de protéines déjà présentes dans l'organisme. Or, l'immaturation des fonctions d'éliminations hépatique et rénale chez le nourrisson, pendant les premiers mois de sa vie (l'alimentation et al, 2000) doit être prise en compte. Il est donc évident qu'un apport protéique important dépasserait les systèmes physiologiques d'élimination et pourrait causer une augmentation de la charge osmolaire et, indirectement, une déshydratation suite à un appel d'eau accentué au niveau de la lumière du tubule rénal. De plus, Lucas A. et al. (1981) ont démontré que l'adipogenèse est favorisée chez les nourrissons non allaités par rapport aux enfants allaités. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les enfants nourris aux laits artificiels présentent une insuliniémie plus importante, se traduisant par une croissance des adipocytes qui pourrait favoriser l'obésité infantile (Lucas et al, 1981).

Ainsi, des études préliminaires ont mis en évidence un lien probable entre la survenue d'un diabète de type 1 et certains facteurs environnementaux vu que l'incidence du diabète dans les pays industrialisés ne cesse d'augmenter.

En outre, une réaction auto-immune contre la cellule β des îlots de Langerhans peut être à l'origine d'une immunisation contre un type de protéines de lait de vache. Cette réaction immunitaire est le résultat d'une séroactivité croisée due à une similitude de structure entre des protéines de lait de vache et des auto-antigènes situés sur les îlots (Levy-Marchal et al, 1995).

De plus, AL Drash et al. (1994) ont montré que comparés aux enfants nourris au sein, les nourrissons allaités avec du lait maternisé présentent un taux plus élevé d'anticorps dirigés contre l'insuline bovine qui est présente dans le lait de vache (AL Drash et al, 1994).

En plus du diabète de type 1, il semble que l'allaitement protège aussi les nourrissons du diabète de type 2 en diminuant de 40% le risque de son développement ultérieurement (Owen et al, 2006). C'est en comparant des adolescents provenant de communautés d'Indiens d'Amérique et de jeunes adultes atteints de diabète de type 1 de la communauté des Indiens Pima, que Pettitt D J et al. (1997) ont montré que les enfants qui avaient été nourris uniquement avec du lait infantile étaient plus susceptibles d'être en surpoids et de développer le diabète de type 2 que ceux qui avaient été nourris uniquement avec lait maternel (Pettitt et al, 1997).



CHAPITRE II: Les produits de glycation avancée

II.1 Formation des produits de glycation avancée

II.1.1 Découverte et notions générales

Les produits de glycation avancée (AGEs, Advanced Glycation end Products) sont issus d'une réaction biochimique non-enzymatique connue sous le nom de la réaction de Maillard. Découverte en 1912 par Louis Camille Maillard (Maillard, 1912), cette réaction est également appelée réaction de brunissement non-enzymatique. La formation des AGEs peut se produire spontanément dans les organismes vivants à 37°C mais aussi lors de la préparation et de la fabrication d'aliments sous l'effet de la chaleur. Responsable notamment en grande partie de la production des arômes et des pigments caractéristiques des aliments cuits, elle revêt une importance particulière dans la chimie des aliments.

La réaction de Maillard est initiée par la liaison entre la fonction aldéhyde d'un sucre réducteur et les fonctions amines d'un acide aminé libre ou d'une protéine (une lysine ou une arginine le plus souvent) (Rabbani & Thornalley, 2010). S'ensuit une réaction complexe au cours de laquelle un certain nombre de composés néoformés, dont les AGEs, apparaît.

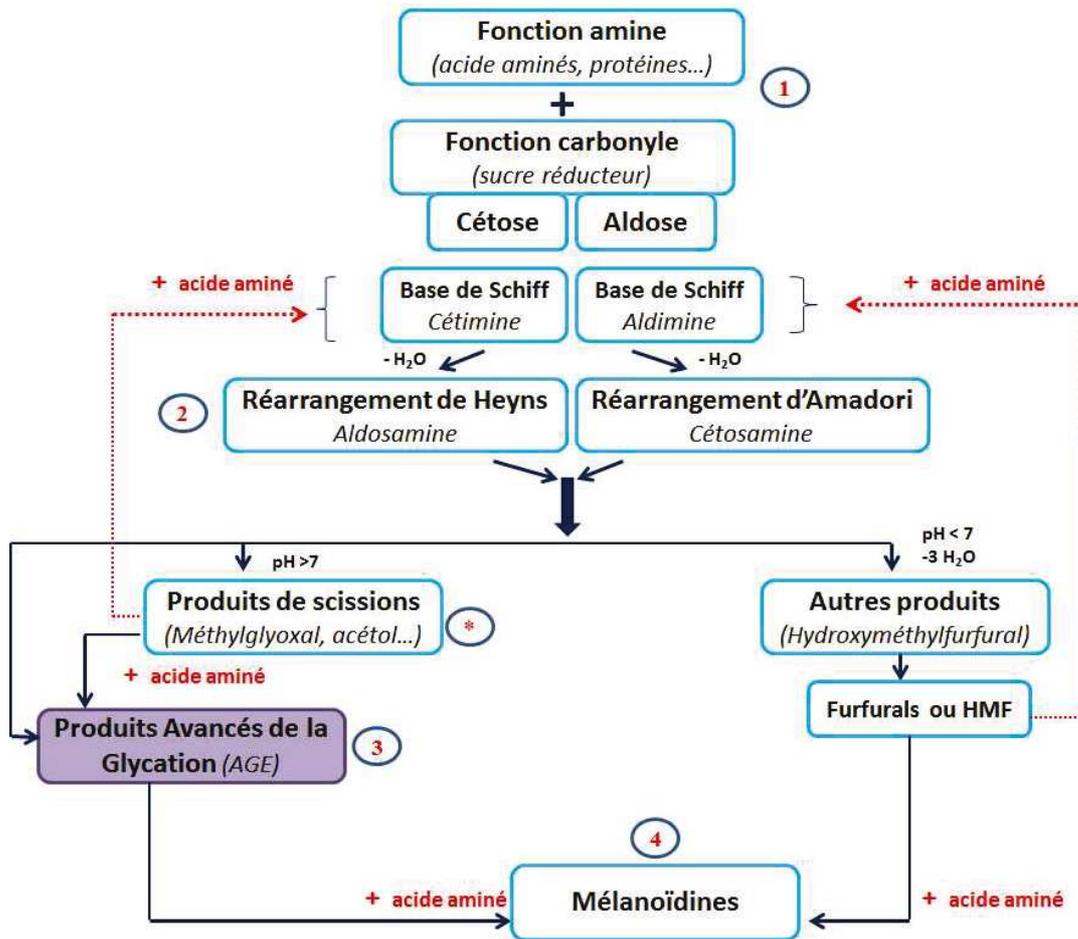


Figure 13 : les grandes étapes de la formation des AGEs d'après (Ames, 1999; Hodge, 1953; Martins, 2003)

Quatre grandes étapes sont décrites (Figure 13):

- (1) La première étape est une glycation réversible et rapide qui correspond principalement à l'addition d'une fonction amine primaire ou secondaire (acides aminés libres ou protéines) sur la fonction carbonylée d'un sucre réducteur, conduisant à la formation d'un produit appelé **base de Schiff** (2). Cette première étape donne naissance à deux produits non stables. Suite à des réarrangements intramoléculaires, la base de Schiff se transforme en des produits plus stables considérés comme les produits du stade précoce de la glycation ou Early Stage Glycation Adducts. Les produits formés dans les

aliments au cours de cette étape sont responsables de la perte nutritionnelle due à la modification d'acides aminés parfois essentiels. Cependant, ils ne contribuent ni à la coloration de l'aliment ni au développement de propriétés aromatiques.

- (3) Cette étape est considérée comme l'étape **avancée** de la réaction de Maillard avec la formation des AGEs. La N^{ϵ} -carboxyméthyllysine (CML) a été le premier AGE isolé et caractérisé *in vivo* par Ahmed, Thorpe et Baynes (1986) à partir de protéines glyquées (Ahmed et al, 1986). Depuis, la CML est considérée comme l'un des principaux biomarqueurs des AGEs (Figure 14). En plus de la CML, d'autres AGEs comme la N^{ϵ} -carboxyéthyllysine (CEL) (Ahmed et al, 2005), la pyrroline (Henle, 2003a), l'acide monolysinylamide oxalique (OMA) (Hasenkopf et al, 2001) et la pentosidine (Henle T, 1997) ont été identifiés.

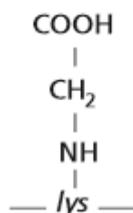


Figure 14 : Structure chimique de la CML

Il existe d'autres parcours réactionnels impliquant des composés dicarboxylés qui peuvent donner naissance aux AGEs sans que le produit d'Amadori ou de Heyns ne soit le précurseur.

Il est à noter que les bases de Schiff et les intermédiaires de la dégradation oxydative des sucres et des lipides peuvent générer des composés dicarboxylés hautement réactifs tels que le glyoxal et le méthylglyoxal (MG) (*). Ce sont de puissants agents de glycation qui peuvent réagir directement avec les acides aminés pour former des AGEs sans passer par un produit d'Amadori (Rabbani & Thornalley, 2010).

- (4) Ainsi, les molécules obtenues peuvent se polymériser ou se condenser pour former des polymères bruns nommés les mélanoidines. Elles sont retrouvées dans différentes matrices alimentaires comme les produits de boulangerie et les produits torréfiés tels que le café (Daglia et al, 2002), mais également dans des divers aliments ayant subi un traitement

thermique, comme la sauce soja (Wang et al, 2007) ou le cacao (Hofmann et al, 1999). Le couple temps-température et le pH impacte fortement la synthèse des mélanoidines (le degré de polymérisation et le poids moléculaire final (Wang et al., 2011)).

Nombreux sont les facteurs qui influencent la vitesse et les voies de la réaction de Maillard. On citera principalement la température, le pH, l'activité de l'eau, la présence d'oxygène, le temps de réaction ainsi que la composition des aliments (concentration des substrats de la réaction).

II.1.2 Formation endogènes des AGEs

Les réactions de glycation se produisent de manière endogène dans tous les tissus ainsi que dans le plasma, dans des conditions physiologiques (Ahmed et al, 1986; Thornalley, 1999)(Ahmed et al, 1986; Thornalley, 1999) . Chez les diabétiques, la formation des AGEs endogènes est principalement due à l'hyperglycémie chronique (Bucala & Vlassara, 1995; Hammes et al, 1999). Les AGEs endogènes sont formés à une température plus basse que celles des aliments transformés. De nombreux dommages et désordres métaboliques sont la conséquence de l'augmentation du taux des AGEs *in vivo* (Boulangier et al, 2002). Dans des conditions pathologiques, les protéines de structure, les protéines plasmatiques ou les protéines cellulaires peuvent être glyquées.

Les produits d'Amadori présentent une utilité clinique non négligeable du fait que leur taux de formation soit directement proportionnel à la concentration de glucose présente dans l'environnement. Dans le cas de patients diabétiques, l'hémoglobine glyquée (HbA_{1c}), un produit d'Amadori, est utilisée comme marqueur du contrôle glycémique (Brownlee, 1995; Koenig & Cerami, 1980).

II.1.3 Apport exogène d'AGEs

Certaines substances consommées peuvent fournir ou potentialiser la formation des AGEs. Le tabagisme (Nicholl & Bucala, 1998) et la nourriture (O'Brien & Morrissey, 1989) sont les deux facteurs les plus étudiés. En effet, Nicholl et al en 1998 ont montré que des AGEs dérivés du tabac s'accumulent sur les LDL et se fixent sur les protéines structurales de la paroi vasculaire des artères coronaires des fumeurs (Nicholl & Bucala, 1998). De plus une étude menée par l'équipe de Vlassara (1997) a également montré que la fumée de cigarette semble être riche en produits de glycation hautement réactifs. Ces derniers, en rentrant en

contact avec les protéines, induisent immédiatement la formation d'AGEs (Cerami et al, 1997).

Cependant, la principale source d'AGEs exogènes reste l'alimentation. Les procédés thermiques largement utilisés, aussi bien dans l'industrie agroalimentaire qu'à domicile, apportent des conditions hautement favorables pour la réaction de Maillard et la formation d'AGEs, en particulier la CML. De multiples études ont d'ailleurs démontré que des mesures appropriées, comme l'élimination de certains procédés ou modes de cuisson, peuvent diminuer considérablement le taux d'AGEs dans les aliments (Koschinsky et al, 1997; Uribarri et al, 2003).

De nombreuses techniques permettent aujourd'hui de doser ces produits dans les matrices alimentaires. Deux principales bases de données ont été récemment publiées (Hull, 2012; Uribarri et al, 2010b). La première étude de l'équipe de Vlassara H. (Uribarri et al, 2010b) est basée sur des analyses ELISA. La seconde a été publiée en 2012 par Hull et al. et fait appel à une autre méthode d'analyse (la chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS) (Hull, 2012). Ces deux études présentent des différences notoires, en particulier dans le dosage de la CML dans les produits gras : la première étude montre des taux bien plus élevés que la seconde. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats. Une nouvelle base de données est récemment publiée confirme les données de Hull (Scheijen et al, 2016).

D'autre part, les résultats de l'étude ICARE, réalisée en France sur 62 adolescents sains, a montré que les produits céréaliers transformés (pain et biscuits) ainsi que les produits carnés constituent la principale source de CML (Tessier, 2012).

Une partie des AGEs de la matrice alimentaire, une fois ingérée, est absorbée au niveau du tube digestif. Les AGEs de haut poids moléculaire sont absorbés d'une manière tardive et retardée, par rapport au AGEs de faible poids moléculaire (Finot, 1981). Dans une étude portant sur des adolescents sains et suite à la consommation d'un repas riche ou faible en AGEs, (Delgado-Andrade et al, 2012) ont montré que l'absorption de la CML est proportionnelle à la quantité de CML ingérée. Koschinsky T et *al.* (1997) ont montré que seul 10% de la quantité ingérée des AGEs est absorbée. Ces résultats ont été confirmés par He et *al.* (1999). En utilisant des AGEs marqués au ^{14}C , ils ont montré que l'absorption intestinale des AGEs chez des rongeurs était de l'ordre de 10 % 72 h après l'ingestion d'AGEs avec un pic sérique à 6-12 h (He, 1999). Une partie de cette fraction de CML absorbée est éliminée

par le rein (Bergmann & Johannsen, 2001). Une étude qui a suivi précisément le devenir d'une dose orale de CML chez le rongeur a montré une cinétique d'apparition plasmatique suivie d'une élimination en quelques heures dans les urines (Alamir et al, 2013). Chez l'homme, Tessier et al (2010) ont montré que la quantité de CML éliminée dans les urines est proportionnelle à la quantité ingérée. L'autre partie, non éliminée par voie urinaire, se retrouve accumulée dans plusieurs organes tels que le cœur, les poumons, la rate (He, 1999), le foie mais également les reins (Bergmann & Johannsen, 2001) (Figure 15).

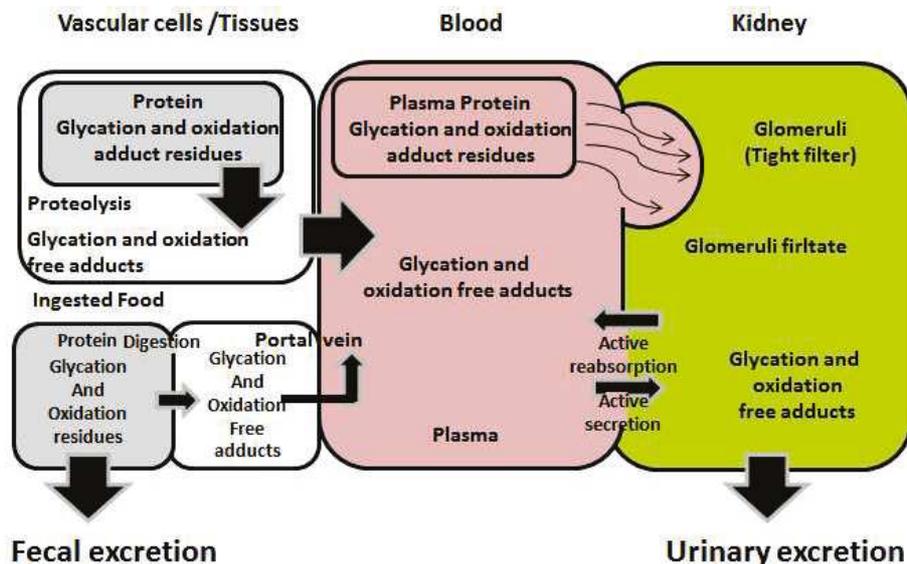


Figure 15 : Absorption, distribution et élimination des AGEs (Thornalley & Rabbani, 2014)

Le reste de la CML ingérée non absorbée va être en partie éliminée par voie fécale (Alamir et al, 2013; Somoza et al, 2006). Roncero-Ramos et *al.*, (2013), ont montré que chez des rats, l'élimination fécale de la CML alimentaire a été estimée à 33% de la quantité ingérée et est fortement influencé par le niveau de la CML alimentaire.

II.1.4 Les AGEs dans les formules infantiles

Le lait étant une matrice idéale pour la réaction de Maillard en raison de sa teneur élevée en lactose et en protéines d'une part, et de la chaleur appliquée pendant la transformation du lait d'autre part, on peut donc s'attendre à une grande variété de produits générés par cette réaction. Les produits déshydratés et les laits infantiles sont les plus concernés en raison de leur supplémentation en lactose. Cette réaction de glycation se produit entre le lactose (sucre réducteur) et une fonction amine portée en général par la lysine des protéines (la β -lactoglobuline mais aussi avec les caséines), naturellement présente dans les produits laitiers (Erbersdobler HF, 1987) (Figure 16).

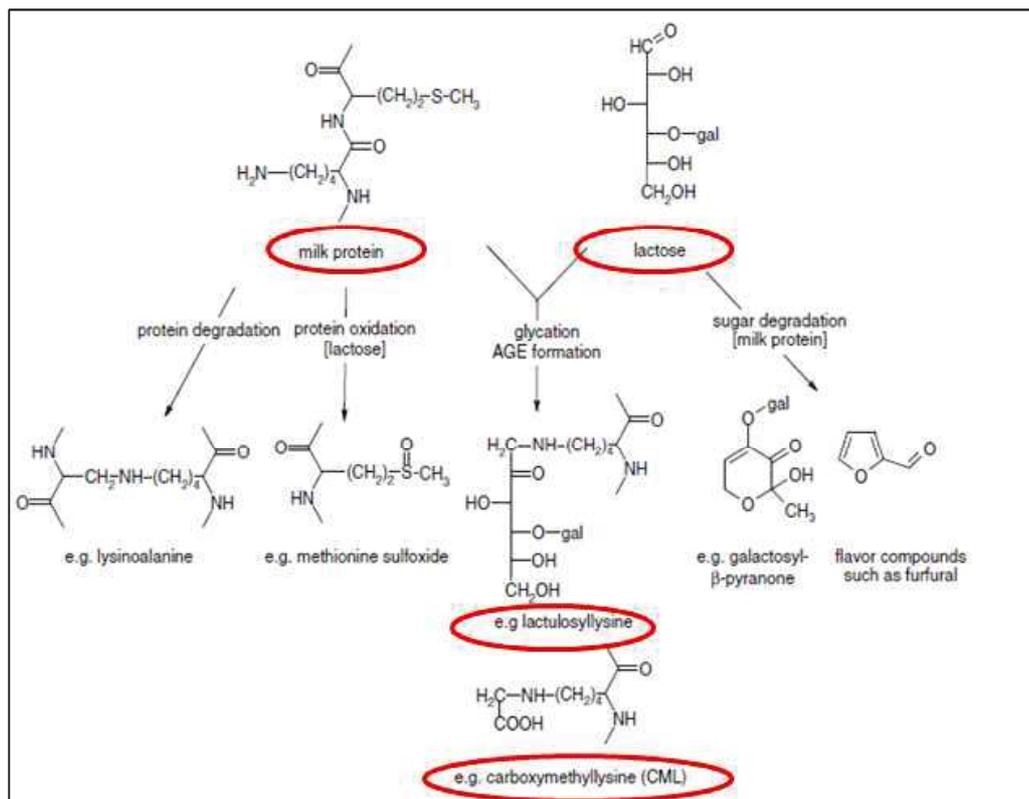


Figure 16 : La réaction de Maillard dans le lait (Pischetsrieder & Henle, 2012)

Les deux conséquences majeures de la réaction de Maillard dans le lait sont d'une part, la modification de la structure physico-chimique des protéines (blocage de la lysine induisant une baisse de la qualité nutritionnelle) et d'autre part, l'apparition de composés néoformés tels que l' α -lactulosyllysine et son produit de dégradation oxydative la CML (B., 1987). Dans les laits, la teneur en CML est en général utilisée comme marqueur du niveau des produits de Maillard. La furosine est également fréquemment dosée.

Ainsi, selon le type de traitement thermique ou procédé, la concentration en CML dans le lait varie (Delatour et al, 2009). (Figure 17).

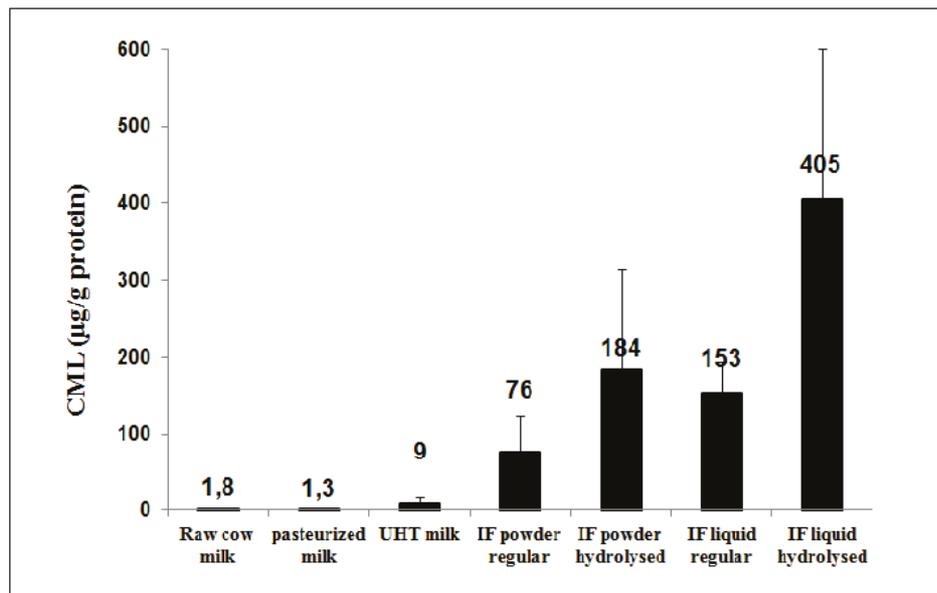


Figure 17 : La teneur en CML dans différents laits (Delatour et al, 2009)

II.2 Le récepteur des AGEs: le RAGE

Certains produits de glycation peuvent agir au niveau cellulaire en se fixant à des récepteurs membranaires et initier plusieurs voies de signalisation. La présence des récepteurs des AGEs a été mise en évidence par l'utilisation d'AGEs marqués à l'iode radioactif (I^{131}) (Schmidt et al, 1992). Ces récepteurs sont présents sur de nombreux types cellulaires qui fixent de façon spécifique les AGEs (Schmidt et al, 1992; Vlassara et al, 1985)

Le récepteur le mieux caractérisé et le plus spécifique vis-à-vis des AGEs est le RAGE (Receptor of AGEs). Le RAGE a été caractérisé à partir de nombreux types cellulaires (monocytes-macrophages, cellules musculaires lisses, cellules mésenchymales, cellules endothéliales, mésothéliales et péritonéales). Ces cellules expriment ce récepteur de manière constitutive. Il s'agit d'une molécule d'environ 50 KD, appartenant à la super famille des immunoglobulines (Ig) (Wautier et al, 2014). Comme le montre la Figure 18, il est composé de trois domaines: un domaine extracellulaire (acides aminés 1 à -339), un domaine transmembranaire hydrophobe (acides aminés 343 à 363) et un domaine intracellulaire (acides aminés 364 à 404). La partie extracellulaire est formée de trois sous-domaines semblables aux Ig (Ig-like) : un domaine **variable V** qui est le principal domaine d'interaction avec les ligands et deux domaines constants (**C1 et C2**) (Wautier et al, 2014).

Du point de vue génomique, le gène RAGE humain est situé sur le chromosome 6, locus 6p21.3, dans la région du complexe majeur d'histocompatibilité III (CMH III) (Wautier et al, 2014).

En plus de la forme membranaire de, RAGE il existe sous deux autres formes :

- Le RAGE soluble: une forme circulante, dont les domaines transmembranaire et intracellulaire sont tronqués. Ces isoformes, formées, soit par épissage alternatif de l'ARNm du RAGE appelé «endogenoussecretory RAGE» (esRAGE), soit par clivage protéolytique du RAGE nommé «cleaved RAGE» (cRAGE). Ces deux isoformes constituent le pool total de RAGEs solubles circulants (sRAGE) (Figure 18)(Schinzel et al, 2001).
- Le DN-RAGE : Une troisième forme fixée à la membrane cellulaire constituée uniquement par les parties transmembranaire et extracellulaire, nommé DN-RAGE pour dominant négative RAGE a été décrite(Schinzel et al, 2001).

Mise à part le RAGE, les AGEs présentent une affinité pour d'autres récepteurs parmi lesquels :

- **l'AGE-R1**, appelé aussi le récepteur CD36 de la famille MRS-B, qui est aussi le récepteur des LDLs oxydées (Ohgami N, 2001,; Ohgami N, 2002). Cette protéine a été décrite

initialement comme la p60, une protéine proche de l'enzyme oligosacharyl-transférase (OST-48) de 50 kDa.

- L'**AGE-R2**, un autre récepteur décrit initialement comme la p90, proche d'un substrat de la protéine kinase C (80K-H) (Gugliucci & Bendayan, 1996).

- L'**AGE-R3**, précédemment décrit comme la galectine-3 ou Mac-2. Il s'agit d'un polypeptide de 35 kd, présentant un motif qui reconnaît des sucres fortement conservé en partie C-terminale.(Beisswenger et al, 1995).

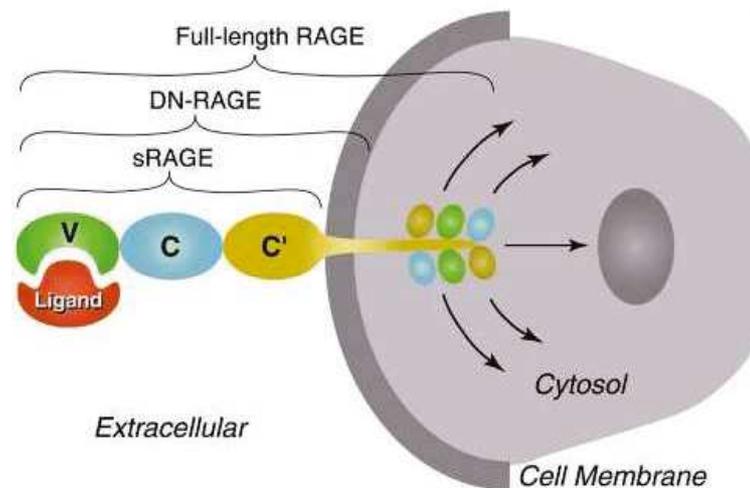


Figure 18 : Description schématique du RAGE, récepteur aux AGEs, et de ses différents domaines (Schmidt et al, 2001)

En plus des AGEs, d'autres molécules ont été identifiées comme ligands du RAGE telles que la HMGB1 (High-mobility group protein-B1/amphoterin) , ou amphotérine C, les protéines S100, le peptide β -amyloïde ($A\beta$), la Heat Shock Protein-70 (HSP70), les Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), les composants du complément C1q andet

C3a, le lipopolysaccharide (LPS), la phosphatidylsérine et les oligonucléotides CpG ont été identifiés comme ligands du RAGE (Leclerc et al, 2009) (Figure 19).

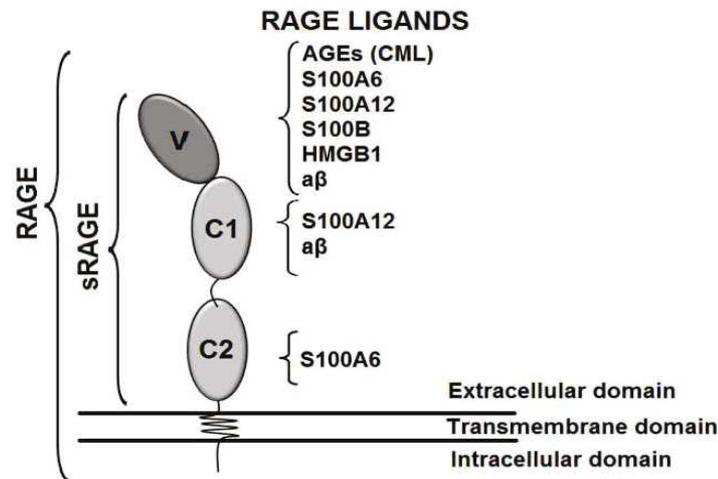


Figure 19: Les différents ligands du RAGE (Leclerc et al, 2009)

II.3 Effets physiopathologiques des AGEs

II.3.1 Induction du stress oxydant et de l'inflammation par les AGEs

La liaison AGE-RAGE active une cascade de signalisation induisant des réponses cellulaires très diverses. Un stress oxydatif se met en place avec production accrue des ERO stimulant la voie de la NADPH-oxydase (Mahmood et al, 2013; Pisoschi AM, 2015). Le stress oxydant s'accompagne d'un état inflammatoire suite à l'activation de NF-κB et la production des cytokines proinflammatoires comme le montre la Figure 20.

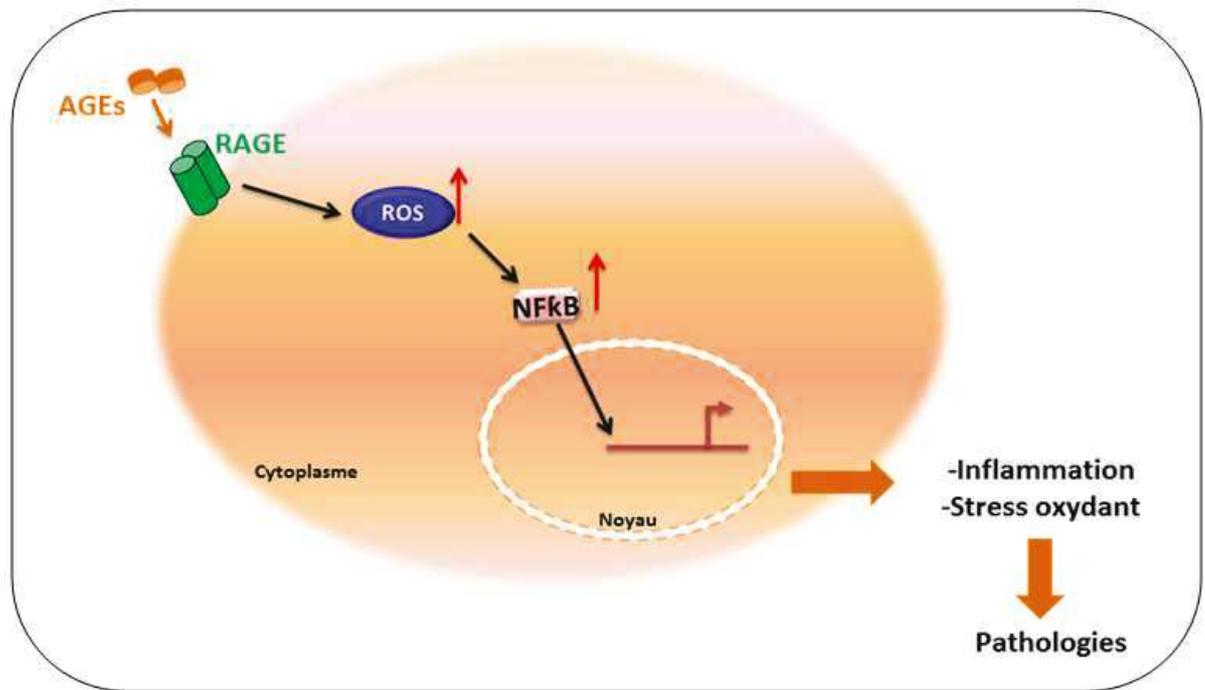


Figure 20 : Schéma simplifié du mécanisme d'action cellulaire du complexe AGE-RAGE

II.3.2 Modulation du microbiote intestinal par les AGEs alimentaires

L'interaction entre le microbiote et l'alimentation agit au final sur la santé de l'individu. Or, différentes études ont montré que les AGEs alimentaires impactent indirectement le microbiote intestinal en agissant sur la croissance et l'activité des microorganismes (Helou, 2014b). Il semble donc pertinent de penser que les AGEs alimentaires peuvent influencer le microbiote intestinal. Plusieurs équipes de recherche se sont penchées sur cette hypothèse.

En effet, Seiquer et al. (2014) ont mis en évidence la présence d'une corrélation négative entre la flore lactique et le taux d'HMF et de la CML, produits d'Amadori présents dans les aliments, en comparant l'effet de deux régimes alimentaires plus ou moins riches en produits de la réaction de Maillard (Seiquer et al, 2014). Ceci semble indiquer que le taux de PRMs produits de la réaction de Maillard précoces et avancés du régime alimentaire impacte

la composition de la flore bactérienne intestinale. Or, il semble difficile d'attribuer les effets observés à un seul composé quand il s'agit d'un régime complexe.

Plusieurs observations ont montré que les mélanoidines semblent jouer plusieurs rôles sur le microbiote intestinal. Un effet antibactérien des mélanoidines du café a été observé sur les microorganismes en culture pure (Daglia et al, 2002). Un effet «bénéfique» sur le microbiote intestinal a également été observé lorsque ces composés agissent comme des fibres alimentaires (Gniechwitz et al, 2008).

En ce qui concerne le lait, à notre connaissance, aucune étude à ce jour ne s'est penchée sur l'effet des AGEs du lait sur le microbiote intestinal.

II.3.3 Implication des AGEs endogènes et exogènes dans les complications des pathologiques

a) AGEs et maladies rénales

Une des fonctions les plus importantes des reins est le maintien du milieu intérieur via l'élimination des déchets métaboliques, la régulation fine de l'homéostasie de l'eau et des électrolytes. Le rein participe aussi à la néoglucogenèse grâce à l'excrétion d'ammonium et au métabolisme des bicarbonates. Le rein contribue également au maintien de l'équilibre acido-basique, au contrôle de la tension artérielle (via le système rénine-angiotensine-aldostérone ainsi que l'homéostasie liquidienne et du sodium) et à la sécrétion d'autres hormones (vasoconstrictrices et vasodilatatrices) (Gougoux, 2005; Guyton, 2006.; Hollenberg et al, 1998). En cas de détérioration de la fonction rénale, on parle d'une insuffisance rénale qui peut être aiguë (agression brutale transitoire) ou chronique (atteinte irréversible de la fonction rénale) selon le degré de l'atteinte de l'organe.

Lors d'une atteinte toxique de l'organisme via des produits chimiques ou alimentaires, les reins sont les premiers organes sollicités. C'est donc aussi l'organe cible dans le cas d'une exposition accrue à des produits de glycation, du fait que c'est le site majeur de la clairance de ces composés (Miyata et al, 1998). La littérature est très abondante quant aux effets des AGEs sur les processus inflammatoires et le stress oxydant chez l'adulte sain et ou dans un contexte pathologique (Bohlender et al, 2005) (Miyata et al, 1998).

Ainsi, le diabète est connu comme la première cause de l'insuffisance rénale. En effet, environ 20 à 30% des diabétiques développent une néphropathie. Il s'agit d'une hyperfiltration qui s'explique par une augmentation du débit de la filtration glomérulaire associé d'une microalbuminurie qui évolue et s'aggrave en protéinurie (Ayodele et al, 2004). Les études animales ont montré l'implication majeure des AGEs mais aussi du récepteur RAGE dans la néphropathie diabétique par exemple. Les animaux diabétiques ont des augmentations significatives des AGEs au niveau du rein (Soulis-Liparota et al, 1995) avec comme conséquence des modifications structurelles majeures se traduisant par un épaissement de la membrane basale une expansion mésangiale, une glomérulosclérose, et une fibrose tubulo-interstitielle (Oldfield et al, 2001). Chez la souris, l'administration d'AGE-BSA induit des changements semblables à ceux observés dans la néphropathie diabétique avec un épaissement glomérulaire de la membrane basale, l'expansion de la matrice mésangiale, l'augmentation de collagène IV et l'expression du TGF- β (Vlassara et al, 1994). Le rôle du RAGE dans le développement de la néphropathie diabétique a été mis en évidence en particulier lors des essais visant la voie d'interaction AGE-RAGE. Une atténuation sensible des atteintes pathologiques rénales ont été observées par l'utilisation d'inhibiteurs tels que l'aminoguanidine et ALT-946 (Forbes et al, 2001). Les traitements par des molécules antagonistes de forme longue du récepteur RAGE (Flyvbjerg et al, 2004) ont également montré des effets bénéfiques sur l'atténuation de la néphropathie. En outre, des souris knock-out RAGE rendus diabétiques accusent moins de dommage structuraux et fonctionnels (Wendt et al, 2003) attestant le rôle majeur joué par le récepteur RAGE dans les troubles rénaux.

A côté des études expérimentales réalisées chez le rongeur, des études épidémiologiques ont permis de confronter les observations sur le rôle des AGE et du RAGE dans les complications rénales. Le niveau de concentration des AGEs est plus élevé chez les patients souffrants d'une maladie rénale, dans un contexte de diabète ou non. Cette augmentation est liée, d'une part, à un défaut de clairance des AGEs alimentaires et d'autre part à une augmentation de la formation d'AGEs endogènes (Henle, 2003b).. Cette élévation du niveau des AGEs sanguins s'accompagne aussi d'une accumulation importante de ces composés dans différents compartiments rénaux (Boulangier et al, 2002).

Il est aisé de comprendre que, dans un contexte d'une alimentation riche en AGEs, le rein fait face à une surexposition d'AGEs, se traduisant par une augmentation transitoire mais importante des AGEs circulants (Boulangier et al, 2002). De plus, les travaux menés par DU et

al. (1998) et Giuliano et al. (1996) ont montrés que l'augmentation intra et extra-cellulaires des taux du glucose entraine l'installation d'un état de stress oxydant. Coughlan et al. (2009) confirment cette observation et reportent que l'activation des RAGE induit une production excessive des radicaux libres oxygénés et surtout oxygénés, en particulier suite à l'activation de la NADPH-oxydase (Coughlan et al, 2009). La réduction de l'apport des AGEs via l'alimentation, comme cela a été montré décrite par plusieurs études (Tessier, 2012; Uribarri et al, 2010a), réduit donc le stress oxydant ainsi que l'inflammation. Ces résultats suggèrent que la diminution de la teneur des AGEs dans notre alimentation protège contre le développement des maladies rénales.

b) AGEs et diabète

P. S. Sharp, S et al (2003) ont observé que chez les patients diabétiques, la concentration sériques d'AGEs était plus importante par rapport aux patients non diabétiques (P. S. Sharp, 2003). Ces niveaux élevés d'AGEs chez des patients atteints de DT2 sont à attribuer majoritairement à des sources endogènes, à savoir l'hyperglycémie qui favorise les réactions de glycation (Brownlee, 2001). C'est ce qui explique que le contrôle de l'hémoglobine glyquée A1c ou de la fructosamine soient, à ce jour, les meilleurs éléments de suivi clinique du DT2 et de ses complications (Boulanger et al, 2002). Il est important de souligner que ces marqueurs ont souvent été associés à la sévérité de la pathologie et de l'atteinte vasculaire liée au diabète sans que la relation de causalité soit entièrement identifiée (King et al, 1994).

Les AGEs s'accumulent dans les différents organes endommagés par le diabète y compris le rein, la rétine et les plaques d'athéroscléroses. Le taux d'accumulation est accéléré à cause de l'état d'hyperglycémie chez ces patients. (Bucala & Vlassara, 1995; Hammes et al, 1999). Il est souvent associé à la plupart des complications vasculaires. Chez des patients diabétiques, (Nakamura et al, 1993) ont mis en évidence un excès d'AGEs dans les plaques d'athérome. Cette accumulation plaide en faveur d'une rigidité artérielle chez des patients diabétiques. En outre, les AGEs ont été retrouvés dans les lésions d'athérosclérose, les cellules musculaires lisses contenant des lipides et les macrophages de personnes atteintes de diabète (Friedman, 1999; Schleicher et al, 1997; Stitt et al, 1997). Une corrélation entre la concentration tissulaire d'AGEs et la sévérité des lésions d'athérosclérose a également été démontrée (Stitt et al, 1997). Plusieurs mécanismes seraient à l'origine des effets des AGEs sur le développement de l'athérosclérose. Il semble que ces composés soient capables de

piéger l'oxyde nitrique et s'opposent à l'élimination des LDL par une diminution de la reconnaissance du récepteur LDL-AGE modifié (Bucala et al, 1994). La liaison des AGEs à l'apolipoprotéine (apo) B altère également sa clairance hépatique et induit la rétention de LDL dans la paroi aortique et la reconnaissance accrue par les macrophages. Par conséquent, il y a une augmentation des LDL-AGEs dans des vaisseaux ce qui accélère la formation d'athérome (Sobenin et al, 1993). Les patients atteints de diabète sont plus enclins à développer une cardiomyopathie et une insuffisance cardiaque que les sujets non diabétiques (Bell, 2003). Des niveaux élevés d'AGEs sériques et de pentosidine sont également associés à une augmentation de l'épaisseur de la carotide et de l'intima-média de l'artère aorte (Lapolla et al, 2007; Yoshida et al, 2005). L'augmentation des niveaux de pentosidine et des malondialdéhyde (un indicateur de la peroxydation des lipides) ont également été observés chez les patients diabétiques avec maladie artérielle périphérique (Lapolla et al, 2007).

i. Importance des AGEs alimentaires dans les complications liées au diabète

(Vlassara et al, 2002) ont montré que les niveaux d'AGEs sériques chez des patients diabétiques sont diminués après une consommation durant deux mois d'un régime alimentaire faible en AGEs. Hofmann et al. (2002) ont également montré que les AGEs sont impliqués dans la destruction des îlots pancréatiques et dans les deux types de diabète T1 et T2. Ainsi, la réduction de la teneur des AGEs exogènes permet de protéger et de maintenir la morphologie (Figure 21) des îlots pancréatiques ainsi qu'une fonction normale dans les différents modèles de diabète (Cai et al, 2008; Hofmann et al, 2002).

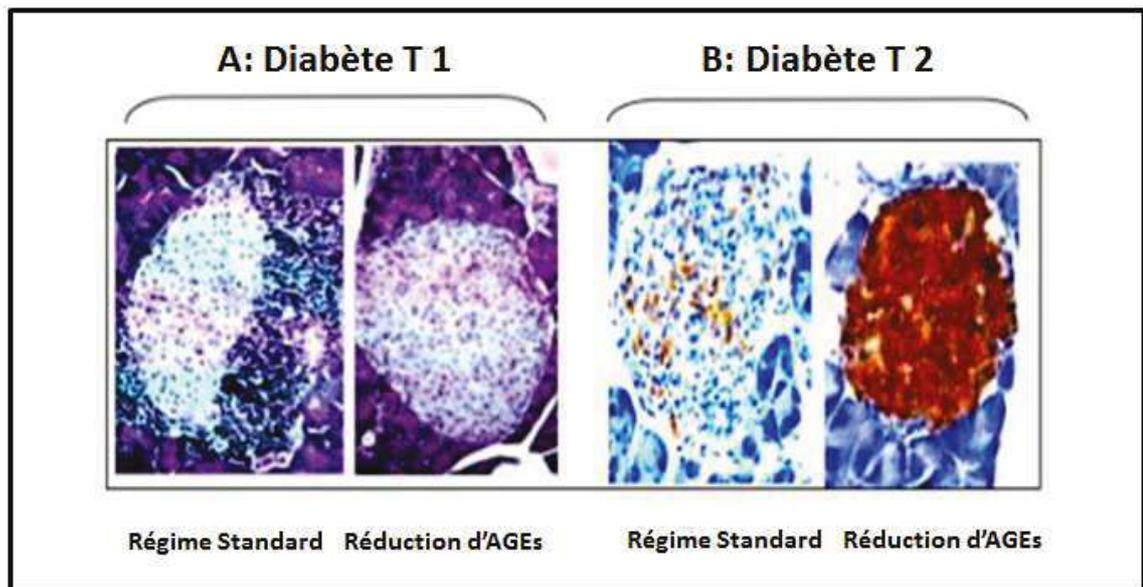


Figure 21 : Comparatif de deux modèles de diabète (T1 et T2) : la réduction des AGEs alimentaires protège la structure des îlots chez des souris atteintes de diabète T1 (A) et de diabète T2 (B.)

Ces études mettent en relief l'importance de l'alimentation qui peut agir comme une source majeure d'AGEs. Une intervention diététique en se basant sur une consommation d'AGEs réduite, pourrait représenter une approche thérapeutique efficace antidiabétique (Mericq et al, 2010; Vlassara et al, 2002). De plus, le MG, un précurseur des AGEs joue un rôle important dans le diabète II, ceci est expliqué par son implication dans la « résistance à l'insuline ». Ainsi, l'étude menée par (Potier et al, 2005) ont montré que le produit dérivé de la réaction de l'insuline avec le MG possède une activité hypoglycémiante de 40% inférieure à celle de l'insuline.

ii. Rôle du système AGEs/RAGE dans les complications du diabète

Divers arguments cliniques et expérimentaux plaident en faveur d'un rôle important de la place du système AGE/RAGE dans la physiopathologie des complications du diabète. Un premier type d'approche a été d'injecter de la streptozotocine ou de croiser des souris génétiquement obèses et diabétiques avec des souris susceptibles de développer un athérome. Dans ces modèles, il a été montré que l'étendue de l'inflammation est devenue plus

importante en présence de l'état d'hyperglycémie (Park et al, 1998; Wendt et al, 2006). D'autres types d'études ont permis de montrer que l'injection du sRAGE ralentit de manière dose dépendante l'athérosclérose et ce indépendamment du profil glycémique ou lipidique. Les souris RAGE -/- croisées avec des souris déficientes en ApoE montrent une réduction des lésions d'athérosclérose (Harja et al, 2008; Soro-Paavonen et al, 2008) et ce dans un contexte diabétique ou non. Ainsi il se dégage de ces études que l'absence du récepteur RAGE réduit les complications liées à l'athérosclérose.

L'augmentation des taux d'AGEs circulants entraîne l'expression du RAGE lui-même, ceci a été observé à la fois dans le diabète de type 1 (Berg et al, 1998), et aussi dans le diabète de type II. Toutefois, les résultats de l'effet de RAGE soluble (sRAGE) dans le diabète et dans d'autres pathologies sont aujourd'hui controversés. Des taux élevés ou diminués de sRAGE ont été trouvés, dans le cas de diabète T2, associés aux complications vasculaires de la maladie.

Ces études mettent en évidence l'importance de l'alimentation qui peut agir comme une source majeure d'AGEs. Une intervention diététique, basée sur une consommation d'AGEs réduite, pourrait représenter une approche thérapeutique antidiabétique efficace. De plus, le MG, un précurseur des AGEs, joue un rôle important dans le diabète T2, par son implication dans la «résistance à l'insuline».

Chez l'enfant, il existe très peu d'études relatant l'implication des AGEs alimentaires dans le développement du diabète et de ses complications. Actuellement, dans la littérature, seules deux études, totalement diamétralement opposées, ont soulevé cette question d'intérêt majeur pour la santé de l'enfant. Les études de (Mericq et al, 2010) ont montré que les enfants allaités au biberon augmentent leur ingestion d'AGEs de 7.5 fois à l'âge de 1 an par rapport aux enfants nourris au sein. Il est important de rappeler que le niveau d'AGEs dans le lait maternel, tout comme dans le lait de vache, est largement en dessous des niveaux trouvés dans les formules commerciales, la quantité pouvant varier d'un facteur 10 selon les traitements thermiques appliqués (Dittrich et al, 2006; Sebekova et al, 2008). Cette augmentation d'ingestion d'AGEs avec l'âge n'a pas été associée directement à une augmentation de la glycémie ou du stress oxydant chez ces enfants. En revanche, les niveaux de MG à 12 mois sont largement au-dessus de ceux des mères. De plus, une association positive entre ce niveau de MG à 12 mois et, le taux d'insuline et l'index HOMA a été retrouvée, suggérant ainsi l'implication de ces molécules dans le développement du diabète chez ces enfants. Des

corrélations négatives entre le niveau de CML à 12 mois et l'adiponectine ont été aussi rapportées dans cette étude. Les travaux de (Sebekova et al, 2008) ont montré que les enfants nourris aux biberons présentent des concentrations de CML dans les urines et dans le plasma, respectivement 46 à 60 fois plus élevées que celles retrouvées chez les nourrissons allaités. En revanche, l'élévation des niveaux de CML n'est pas associée à une plus grande sensibilité à l'insuline chez les nourrissons âgés de 7 à 10 mois d'âge. . Dans l'étude ICARE conduite sur des jeunes adultes, il a été démontré que la consommation d'aliments hautement chauffés, en comparaison avec une alimentation cuite à la vapeur, entraîne une hausse des taux plasmatiques de la CML libre et un déclin de la sensibilité à l'insuline. Toutefois, aucune corrélation entre ces deux paramètres n'a pas été mise en évidence (Tessier, 2012). Il est aussi important de noter que, contrairement aux études réalisées chez l'adulte, aucun signe de stress oxydant ni de microinflammation contribuant à la résistance à l'insuline n'a été mis en évidence dans ces essais.

Au-delà des maladies métaboliques, les AGEs sont aussi impliqués dans plusieurs pathologies et complications: vieillissement (Van Puyvelde K, 2014), maladies neurodégénératives et cancéreuses (Sebekova et al, 2008). Ces effets semblent médiés par une altération du statut oxydant / anti-oxydant. Le recours à des antioxydants est une approche thérapeutique très souvent utilisée pour limiter les effets de ces composés pro-oxydants (Soriani et al, 1994).



PARTIE II: Objectifs

Les maladies chroniques sont la première cause de mortalité et leur prévalence ne cesse d'augmenter (l'OMS prévoit une augmentation de 17% au cours de la prochaine décennie). Depuis plusieurs années, des études épidémiologiques et expérimentales ont montré que le stress environnemental à un âge précoce est une des causes de ces maladies. Ce stress peut provenir d'un déséquilibre nutritionnel (famines, surnutrition, carences en vitamines et minéraux), de la toxicité du milieu (air, eau, alimentation) ou de certains modes de vie (sédentarité). Il laisserait des marques épigénétiques irréversibles et ses effets peuvent s'accroître au fil des générations.

Cependant, la plasticité du génome offre, pendant les périodes précoces du développement, des possibilités d'intervention sur ce processus. Ces périodes d'opportunité doivent nous permettre de réduire les risques de maladie à long terme.

Notre objectif est de mieux comprendre les facteurs de risque provenant de l'alimentation postnatale, susceptibles d'être impliqués dans les phénomènes de programmation. Parmi ces facteurs de risque, les contaminants néoformés issus du traitement thermique inévitable des formules infantiles doivent être pris en compte au vu de la période précoce d'exposition.

C'est pour cette raison que nous avons étudié l'impact de la consommation de deux formules lactées destinées au porc RCIU et différant par leur teneur en CML. Nous nous sommes focalisés plus précisément sur le RCIU du fait de l'immaturation de ses organes et de la défaillance de son système antioxydant installé dès la vie *in utero* par la restriction foeto-placentaire. Cet état physiopathologique pourrait lui conférer une sensibilité plus accrue aux composés de glycation pro-oxydants.

La partie résultats est subdivisée en trois chapitres:

Dans le chapitre III, nous avons évalué l'impact des **AGEs** des formules lactées sur la programmation du stress oxydant et de l'inflammation au niveau du rein et du foie. Une partie de ces données a fait l'objet du premier article publié dans « Molecular Nutrition & Food Research ».

Dans le chapitre IV, toujours dans l'idée qu'une consommation de lait riche en AGEs est associée au développement ultérieur des pathologies chez le RCIU, nous avons étudié son influence sur le microbiote intestinal. Leur présence pourrait moduler le contenu digestif en populations bactériennes (bénéfiques et pathobiontes) avec des conséquences à long terme sur leur système de défense anti-oxydant. Ce travail a fait l'objet d'un second article qui est soumis dans le journal «Free Radical Biology and Medicine».

Dans le chapitre V, sont présentés des résultats préliminaires relatifs aux travaux sur l'effet du MG dans la programmation du diabète. Le troisième article (publié dans «International Journal of Endocrinology») traite des effets des produits de glycation sur la fonctionnalité de la cellule β pancréatique. Ce travail permet d'évaluer l'effet de l'exposition périnatale au méthylglyoxal sur l'activité sécrétoire de la cellule pancréatique.

Enfin, en annexe, se trouve une revue de synthèse (publiée dans «European Journal of Nutrition») récapitulant les données disponibles sur les effets potentiels des composés alimentaires et de l'exercice physique sur la «déprogrammation»



Partie III : Résultats

CHAPITRE III: Impact des AGEs des formules sur la programmation développementale du stress oxydant et de l'inflammation au niveau du rein chez le porc RCIU: Article 1

Formula-derived advanced glycation end products are involved in the development of long-term inflammation and oxidative stress in kidney of IUGR piglets. ELMHIRI. G., et al., Mol Nutr Food Res. 2015 May;59(5):939-47. doi: 10.1002/mnfr.201400722. Epub 2015 Mar 18.

III.1 Introduction

Bien que l'allaitement au sein reste un moyen inégalé de donner aux nourrissons la nourriture idéale pour une croissance et un développement sains et que les propriétés anti-infectieuses du lait maternel contribuent à les protéger contre une multitude de maladies, l'allaitement à base de formules reste une pratique très répandue. Selon l'OCDE, ce taux dépasse les 60%. Ce type d'allaitement n'affecte en rien la santé des enfants et permet, dans la plupart des cas, de couvrir les besoins spécifiques des nourrissons leur permettant d'avoir une croissance harmonieuse. Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucune étude qui décrit les effets des produits de glycation présents dans les formules infantiles sur la santé à long terme et encore moins chez des enfants nés prématurément ou avec un RCIU. Plus particulièrement, il est important de savoir si ces composés pourraient représenter une contrainte physiopathologique supplémentaire chez le RCIU et contribuer à la programmation postnatale de défaillances rénales. Naissant avec un faible poids à la naissance, le RCIU se caractérise par une immaturité de plusieurs de ses organes dont le rein (Schmidt et al, 2005) (Figure 22) et présente une défaillance de son système de défense antioxydant. Ces situations pourraient en effet le rendre plus vulnérable à un stress supplémentaire engendré par la présence de composés de glycation issus des formules infantiles, base exclusive de son alimentation au cours des premiers mois de vie.

L'allaitement à base de formules infantiles ne favorise pas le développement optimal du rein chez l'enfant de faible poids à la naissance (Schmidt et al, 2005) due probablement à la défaillance de son système d'élimination rénale (Wilkins, 1992). D'autres études ont montré, chez les prématurés, que la nutrition parentérale avec des formules ne semble pas altérer la

fonction d'élimination rénale immédiate. Cependant, aucune précision sur des effets à plus long terme des effets de l'alimentation à base de formules n'est indiquée dans ces études.

Ainsi dans ce travail notre objectif principal est d'évaluer l'impact des AGEs d'origine alimentaire (via la consommation d'une formule hautement chauffée, à teneur élevée en CML), au cours de la période postnatale précoce, sur la réponse de la cellule rénale à la surcharge en composés de glycation.

Pour répondre à cette question, nous avons choisi le porc comme modèle d'étude pour plusieurs raisons :

- Ce modèle reproduit parfaitement toutes les pathologies de la programmation du RCIU (Mickiewicz et al, 2012; Mostyn et al, 2014; Poore & Fowden, 2003).
- Ce modèle a été validé au laboratoire et a fait l'objet de plusieurs publications (Attig et al, 2013a; Attig et al, 2008a; Mostyn et al, 2014). Il se prête bien aux expériences d'allaitement artificiel contrairement aux rongeurs. Les analogies anatomiques, physiologiques et nutritionnelles avec l'homme font du porcelet un modèle de choix pour l'évaluation des effets de la présence des produits issus de la réaction de Maillard dans le lait sur la santé de l'enfant.

Pour tester notre hypothèse, nous avons utilisé 16 porcelets RCIU femelles réparties au hasard en deux groupes, nourries soit avec du lait faiblement chauffé à 37°C pendant 5 min (LHF : Low Heated Formula, n = 8) ou, soit avec du lait hautement chauffé à 120° C pendant 20min (HHF : High Heated Formula, n = 8) jusqu'au sevrage (jour 36). Ensuite, tous les animaux ont reçu une alimentation solide *ad libitum* jusqu'à l'euthanasie au jour 54. Au cours du développement, la CML a été quantifiée dans le lait, le plasma, les matières fécales et les reins par HPLC-MS/MS. Des échantillons de sang ont été prélevés avant et après le sevrage et

utilisés pour le dosage du sodium, du potassium, de l'urée et l'analyse de la créatinine. Au jour 54, des études histomorphométriques, d'immunofluorescence, Western blot et Oxyblot ont été réalisées sur les tissus rénaux afin de localiser les sites d'accumulation des AGEs.

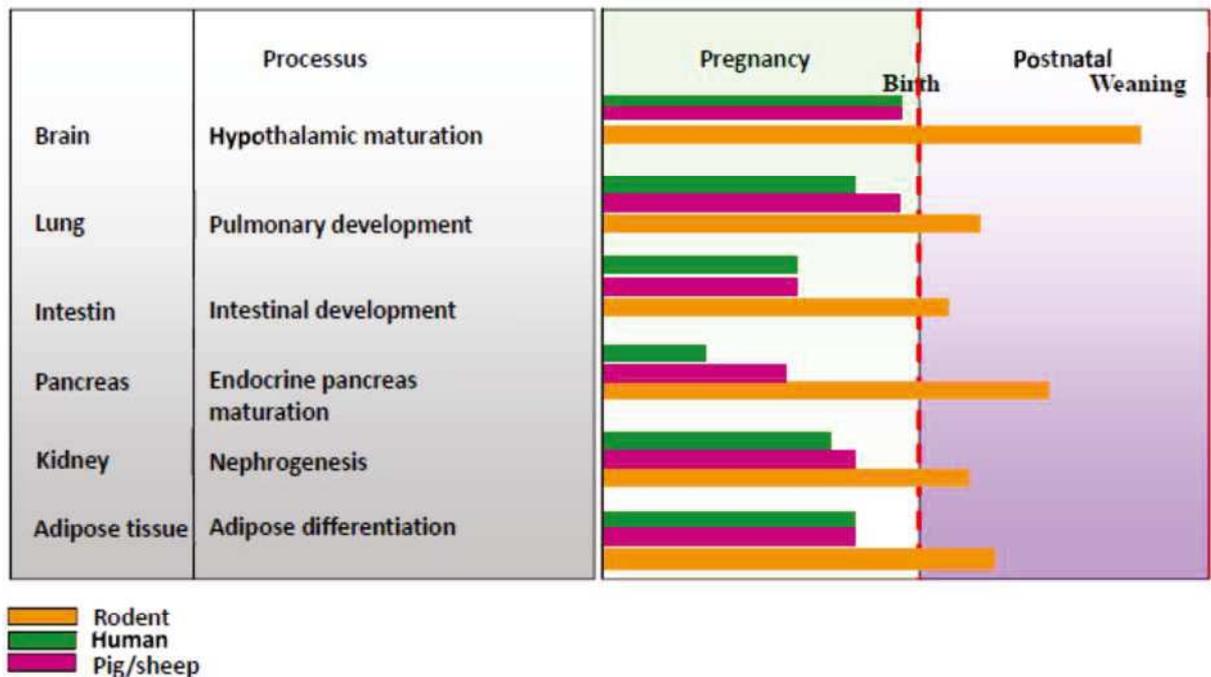


Figure 22 Chronologie du développement de différents organes selon les espèces (Homme, porc, brebis, rongeurs.) Adapté d'après (Fowden et al, 2006).

III.2 Résultats marquants

Nous avons montré que la formule hautement chauffée (HHF) présente des **niveaux élevés de CML** par rapport à la formule faiblement chauffée (LHF). Dans le plasma, le taux de **la CML libre est significativement élevé** lorsque les animaux ont consommé la formule hautement chauffée (HHF) par rapport au groupe LHF. Cette augmentation du taux de la CML est associée avec un **taux significativement élevé du récepteur soluble RAGE (sRAGE)** dans le plasma des RCIU recevant la formule HHF par rapport au groupe LHF.

Également, les animaux du groupe HHF montrent une **augmentation significative de la CML dans les fèces** par comparaison avec le groupe LHF. En revanche, aucune différence n'a été observée au niveau de la CML (libre et protéique) lorsque les animaux ont reçu une alimentation solide.

L'étude d'immunofluorescence a révélé la **présence de la CML dans les noyaux des cellules rénales** chez les deux groupes LHF et HHF. Cependant cette accumulation semble être beaucoup plus importante dans les cellules rénales du groupe HHF. Par comparaison avec les animaux allaités, nous avons observé **une absence totale de la CML dans les compartiments cellulaires du rein**. Ce résultat indique que le marquage nucléaire révélé chez les animaux HHF et LHF est lié à la présence des AGEs dans ces formules. D'autre part, l'analyse histomorphométrique a révélé une **diminution significative du diamètre des glomérules** et une altération minime de la structure du rein. Néanmoins, aucune différence de la densité glomérulaire n'a été observée entre les deux groupes. A notre connaissance, il n'existe pas de données *in vivo* dans la littérature révélant la présence de la CML ou d'autres AGEs dans le noyau des cellules rénales..

Nous avons également évalué les paramètres biochimiques au cours du développement des porcelets et nous avons montré que, durant la période d'allaitement artificiel, **les taux de cholestérol** ainsi que **d'urée sont significativement plus élevés pour le groupe HHF** par rapport au groupe LHF. Néanmoins, aucune différence n'a été observée pour ces paramètres au jour 54, lorsque que les porcelets étaient sous un régime diversifié.

Concernant l'expression des gènes clefs impliqués dans la régulation du système rénine-angiotensine (AT1, AT2) et de l'apoptose (la caspase 3, la caspase 8), nous avons montré par qPCR que la consommation de la formule riche en CML a induit une augmentation significative de l'expression de ces gènes dans le groupe HHF comparé au groupe LHF. Par ailleurs, afin d'étudier l'état d'activation de la protéine pro-inflammatoire et le récepteur des

AGEs au niveau du rein, nous avons quantifié l'expression de la protéine NF- κ B et sRAGE dans les deux groupes, par Western blot et par dosage ELISA. Les résultats révèlent une augmentation significative du sRAGE, confirmé par les deux techniques dans le groupe HHF. Cependant, l'expression de l'isoforme cytoplasmique du RAGE est diminuée dans le groupe HHF.

Ainsi, la formule riche en CML a induit l'installation d'un processus pro-inflammatoire dans le rein. Ceci a été confirmé par qPCR et Western blot. En effet, nous avons montré une surexpression significative du facteur NF- κ B, accompagnée d'une sur-activation de p62-NF- κ B. De plus, le taux plasmatique d'IL-18, cytokine pro-inflammatoire dosée par ELISA, est augmenté dans le groupe HHF comparé au groupe LHF.

Il est très probable que la présence des AGEs induise une perturbation fonctionnelle au niveau des reins des porcelets RCIU comme le montrent des modifications délétères de protéines impliquées dans le système de défense antioxydant au niveau du rein. Une augmentation du niveau d'oxydation des protéines totales dans le rein a été mise en évidence chez les animaux consommant la formule riche en CML.

III.3 Conclusion

L'ensemble des résultats exposés dans ce premier chapitre montre que le traitement thermique des formules induit une augmentation importante de la CML et que la consommation de ces formules pourrait exposer les enfants à un risque plus important de « **programmation d'un stress oxydant et à l'inflammation** ». Grâce à notre modèle d'étude sur le porc RCIU naturel, nos résultats suggèrent que les reins des individus souffrant d'un retard de croissance intra-utérin pourraient être une **cible préférentielle** de cette

programmation, compte tenu du rôle joué par cet organe dans l'élimination de ces glycotoxines L'ensemble des données présentées dans ce travail a également permis de mettre en évidence un effet « pro-inflammatoire – pro-apoptotique – pro-oxidatif » des AGEs au niveau rénal. Ces effets observés sont essentiellement dus à une accumulation tissulaire à **long terme de la CML et/ou d'autres produits de glycation dans les noyaux des cellules rénales**. La mise en évidence des différentes isoformes du récepteur des AGEs (**sRAGE et RAGE**) dénote que la consommation accrue de produits riches en AGEs modifie le statut circulant de ces récepteurs dans le but d'assurer une meilleure élimination de ces composés.

D'un point de vue clinique, au vu de nos résultats, il nous semble important que d'autres études expérimentales chez l'animal puissent être menées sur un effectif plus important afin de valider ou d'infirmer ces observations. De même, il est nécessaire de réaliser des expériences sur le porc non RCIU pour déterminer si ces effets sont liés au statut du RCIU. Cliniquement, on pourrait imaginer conduire des essais cliniques sur des enfants recevant deux formules du commerce contenant des niveaux différents de CML (haut bas). Il serait envisager de mesurer à 1 an, 2 ans et idéalement à l'âge adulte, les paramètres biochimiques en rapport avec l'intégrité de la fonction rénale (créatinine, clairance rénale...) et des paramètres de la tension artérielle chez l'adulte. Ce type d'étude permettrait de présager des effets potentiels de la consommation précoce des AGEs des formules sur la défaillance rénale et la programmation à long terme de l'hypertension.

RESEARCH ARTICLE

Formula-derived advanced glycation end products are involved in the development of long-term inflammation and oxidative stress in kidney of IUGR piglets

Ghada Elmhiri¹, Dier F. D. Mahmood^{2,3}, Celine Niquet-Leridon¹, Philippe Jacolot¹, Stephane Firmin¹, Lydie Guigand⁴, Frederic J. Tessier¹, Thibaut Larcher⁴ and Latifa Abdennebi-Najar¹

¹ UP-EGEAL 2012.10.101, Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, Beauvais, France

² UMR 8256 UPMC Université Paris 6, CNRS INSERM, Department of Adaptation and Ageing Biology 8256/ERL 1164, Paris, France

³ Biology Department, School of Science/University of Sulaimani, Sulaimani-KRG, Iraq

⁴ INRA, UMR 703 APEX, Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris), Nantes, France

Scope: Formula-derived dietary advanced glycation end products (AGEs) may promote programming of inflammation and oxidative stress in the kidney of intrauterine growth retardation (IUGR) piglets.

Methods and results: IUGR piglets received either a low temperature heated formula ($n = 8$) or a high temperature heated formula (HHF: $n = 8$) or suckled naturally for 3 wk postnatally. Then they were fed with normal ad libitum regular diet. N(ϵ)-carboxymethyllysine (CML) was measured in plasma, feces, and formula by HPLC/MS-MS. CML was detected by immunofluorescence in kidney cells. Target renin–angiotensin—apoptotic, pro-inflammatory genes—p62 NF- κ B, and soluble receptor of AGE (sRAGE) levels were quantified. Compared with that in controls, free CML and plasma urea increased significantly in the HHF-fed group at PND36 ($p < 0.05$). CML was detected in the nuclei of renal tubular cells of formula-fed piglets but not in suckled ones. This presence of CML was associated with the activation of the soluble receptor of AGE. AT1, AT2, caspase 3, caspase 8, NF- κ B, p62 NF- κ B, and total protein oxidation in kidney were higher in HHF-fed group as compared to LHF-fed group ($p < 0.05$).

Conclusion: Food processes aimed at reducing the concentration of AGEs in infant formula are urgently needed and may be therapeutically relevant for premature and/or IUGR babies.

Keywords:

Advanced glycation end products / Infant formula / Intrauterine growth retardation / Kidney disease / Programming



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Received: October 8, 2014

Revised: December 31, 2014

Accepted: January 27, 2015

1 Introduction

During the past three decades, there has been an increase in the prevalence of low birth weight (LBW). Approximately 9.6 % of babies have an LBW due to prematurity or intrauterine growth retardation (IUGR) [1]. IUGR is defined as “a foetus that fails to reach his or her potential growth” with a birth weight below the 10th percentile for gestational age [2]. IUGR is one of the leading causes of prenatal morbidity and babies born with IUGR are more likely to demonstrate cardiovascular diseases, type 2 diabetes, hypertension, and renal function in adulthood [3, 4].

Correspondence: Professor Latifa Abdennebi-Najar, UP-EGEAL 2012.10.101, Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, 19 Rue Pierre Wagué, Beauvais 60000, France

E-mail: latifa.najar@lasalle-beauvais.fr

Fax: +33-0-3-44-06-25-26

Abbreviations: AGEs, advanced glycation end products; CML, N(ϵ)-carboxymethyllysine; dAGEs, dietary advanced glycation end products; HHF, high temperature heated formula; IF, infant formula; IUGR, intrauterine growth retardation; LBW, low birth weight; LHF, low temperature heated formula; MDA, malondialdehyde; RAGE, receptor of AGE; sRAGE, soluble receptor of AGE

During the first 6 months of life, formula-fed infants are exposed to advanced glycation end products (AGEs) generated by the heat treatment process that occurs during the manufacture of infant formulae (IFs) [5]. AGEs represent a complex class of compounds that are formed either exogenously or endogenously from heterogeneous precursors. The compound N(ϵ)-carboxymethyllysine (CML) is one of the better-characterized end products frequently used as an AGE/ALE (advanced lipoxidation end product) marker in laboratory studies. CML is absorbed into the bloodstream after consumption and excreted via the kidney; its concentration in the plasma and urine of formula-fed infants is 46- and 60-fold higher, respectively, than breast-fed infants [6]. AGE-induced effects are mediated primarily through the plasma membrane receptor of AGE (mRAGE), and CML is a well-known ligand for RAGE [7]. In addition, soluble RAGE (sRAGE) has been reported to be produced by natural alternative splicing and by the action of membrane-associated proteases, generating endogenous secretory RAGE (esRAGE) and cleaved RAGE (cRAGE), respectively [8]. sRAGE has been proposed as a biomarker of vascular disease severity and outcome, especially in individuals with diabetes and kidney dysfunction [9].

In healthy humans, dietary AGEs (dAGEs) correlate with circulating AGEs, such as CML, and are an established marker of oxidative stress [10]. Recently dAGEs have been shown to promote chronic oxidative stress and inflammation and thus can be considered as modifiable risk factors for the development of metabolic syndrome [11]. By contrast, restricting dAGE consumption in healthy subjects [12] and patients with kidney diseases [13] reduces oxidative stress and inflammation markers. These findings suggest that avoiding dAGEs protects against the development of kidney diseases. Thus far, little is known about the renal side effects of AGEs derived from IF in infants with IUGR. This question is of particular interest because developmental programming of kidney diseases is prone to occur in IUGR [14]. Moreover, investigations of the effect of IF-derived AGEs on the kidney function in IUGR infants are lacking. We hypothesized that the early exposure to IF-derived AGEs induces inflammation and oxidative stress in the developing kidney and consequently enhances programming of hypertension and kidney diseases in IUGR individuals. Here we show that IF-derived AGEs have an effect on inflammation and oxidative stress in renal cells and are associated with persistent accumulation of CML in the nuclei of renal tubular epithelial cells in IUGR piglets. Moreover, liver toxicity has been revealed in animals fed heat-treated formula. These results identified evidence that AGEs-derived from heat-treated IFs can have long-lasting health implications in LBW individuals.

2 Materials and methods

The experimental protocol was designed in compliance with recommendations of the French law (Decret: 2001–464 29/05/01) and EEC (86/609/CEE). Sixteen naturally occurring

Table 1. General chemical composition of formula milk (average values)

Components	Nutritional values	Nutritional complements
Skimmed milk	Crude proteins 22.50%	Vitamin A 50 000 UI/kg
Milk serum	Fat content 12.10%	Vitamin D3 10 000 UI/kg
Copra	Crude fiber 0.02%	Vitamin C 150 mg/kg
Palm	Crude ash 7.20%	Vitamin E 100 mg/kg
Dextrose	Lysine 1.80%	Vitamin B1 3 mg/kg
Starch	Calcium 0.82%	Vitamin K3 2 mg/kg
Minerals	Phosphorus 0.74%	Cuivre 22 ppm/kg
Vitamins	Sodium 0.51%	
Additives	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (DSM 7133) and <i>Enterococcus</i> 1.25 × 10 ⁹ CFU/kg	

IUGR piglets, generated according to our previous studies [15–17], were randomly divided into two experimental groups and were fed from day 15 (PND15) until day 36 (PND36) with either high temperature heated formula (HHF: 120°C for 20 min) or low temperature heated formula (LHF: 37°C for 5 min). Formula consumed ad libitum by piglets was refreshed five times daily (08:00, 12:00, 16:00, 19:00, and 23:00; Porkivi, Celtaït, France). The number of milk feedings per day was gradually decreased to three by the 36th day. Formula was reconstituted at 140 g/L of water. The detailed composition of milk formula is detailed in Table 1. Since Vitamin B1 and fatty acids are susceptible to degradation by heating (approximately 14% of vitamin B1 was degraded in the pig formula after heat treatment) and in order to ensure optimal development, we supplemented the animals with a starter diet (Porkisec 224, Celtaït, France; Table 1). After weaning, all animals received an ad libitum solid diet until euthanasia on day 54 (PND54). CML was quantified by HPLC-MS/MS in formula, plasma (PND36, PND54) and also from kidney extracts from all groups [18] (Supporting Information Methods). Blood samples were collected on PND36 and used for biochemical analysis of a number of biochemical parameters including sodium, potassium, urea, creatinine, triglycerides, glucose, cholesterol, and glycated hemoglobin. Kidneys were dissected at post mortem on PND54, and histological studies were performed using the protocol described previously [19]. The detection of CML was performed in frozen sections of kidney samples using immunofluorescent labeling of mouse mAb against CML (Microcoat biotechnologies, Bernried, Deutschland) assessed by serial scanning with He-Ne and argon ion lasers on a C1 Nikon laser scanning confocal microscope. Expression of NF- κ B, caspase 3, caspase 8, and AT1 and AT2 genes was quantified by real-time PCR. The secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-18 was measured by ELISA (Merck Millipore, France). p62 NF- κ B, RAGE, and sRAGE were quantified in cytoplasmic and

Table 2. General chemical composition and digestible energy of starter diet (average values)

Piglet feed	Porkisec 224 (starter)
Digestible energy	3800 kcal/kg
Dry materials	93.40%
Crude proteins	21.00%
Fat content	11.00%
Crude fiber	1.70%
Ash	5.90%
Starch	16.50%
Lactose	20.00%
Lysine	1.50%
Methionine	0.55%
Methionine + cystine	0.85%
Threonine	0.90%
Tryptophan	0.28%
Calcium	0.90%
Phosphorus	0.64%
Sodium	0.35%
Vitamin A	15 000 UI/kg
Vitamin D3	2000 UI/kg
Vitamin E	160 mg/kg
Vitamin B1	1.50 mg/kg
Vitamin K3	0.50 mg/kg
Vitamin C	200 mg/kg
Cuivre	155 mg/kg
Enzyme per kilogram :	750 FYT/kg
6-phytase EC 3.1.3.26	
Antioxidants	Ethoxyquin, propyl gallate, butylated hydroxytoluene

nuclear isolated plasma (sRAGE) using ELISA and Western blotting according to the manufacturer's instructions (RAGE ELISA kit, Life Sciences Advanced Technologies Cat. E07S0283, USA, NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Kit Thermo Scientific Cat.78833, France). The level of total kidney protein oxidation was analyzed by Oxyblot 1D using the OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit according to the manufacturer's instructions (Millipore, Cat. S7150, USA). The level of malondialdehyde (MDA) in liver samples was quantified by HPLC method adapted from Cachon et al. [20]. Glomerular quantification was measured by our previous method [19]. Statistical significance was calculated by *t*-test.

3 Results

3.1 HHF diet did not modify body growth and food intake

To assess the effect of diet on body growth, piglets were weighed, and formula intake per kilogram body weight was measured daily. We did not observe differences between the groups in both the weights (LHF 1.2 ± 0.14 kg vs. HHF 1.18 ± 0.06 kg at birth, LHF 22.87 ± 2.36 kg vs. HHF 21.37 ± 0.68 kg on PND54) and formula intake (LHF piglets 219 ± 20 mL/kg/day, HHF piglets 200 ± 20 mL/kg/day). Slight but not persistent decreases in milk intake and body growth were

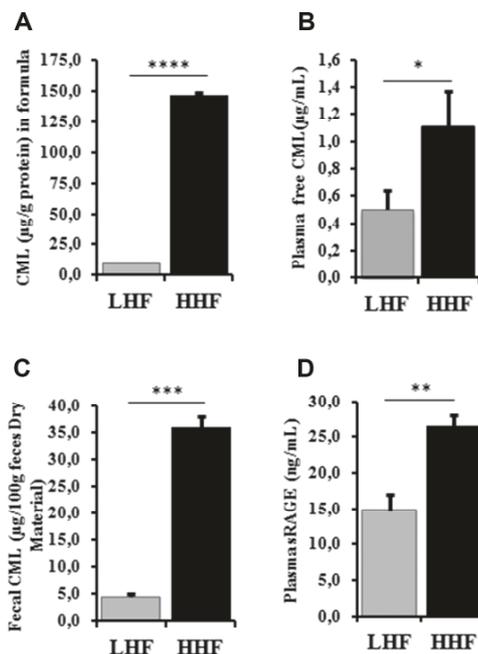


Figure 1. CML determination in formula, plasma, and feces on PND36. CML levels in the formula (A), plasma (B), and feces (C) were quantified by HPLC/MS-MS. Determination of plasma level of sRAGE by ELISA (D). Data are expressed as mean \pm SEM. Significant difference (*t*-test) between HHF ($n = 8$) and LHF ($n = 8$) groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; ns, not significant.

observed during the first 2 days of the experiments in the HHF group compared with LHF group (results not shown).

3.2 HHF diet increased plasma levels of CML and sRAGE and also increased fecal excretion of CML

HHF contained significantly ($p < 0.0001$) higher levels of CML compared with LHF (Fig. 1A). Accordingly, free CML concentration was significantly increased in the plasma of HHF group ($p = 0.035$; 0.5029 ± 0.139 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$ vs. 1.120 ± 0.2674 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$; Fig. 1B). Fecal elimination of CML in piglets was significantly increased in the HHF-fed group ($p < 0.0001$; 4.4822 ± 0.57791 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$) compared with LHF animals (36.146 ± 1.8006 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$; Fig. 1C). Plasma sRAGE level was elevated significantly in HHF-fed group compared with LHF-fed animals ($p = 0.0001$; 14.74 ± 1.388 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$ vs. 26.62 ± 1.388 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$; Fig. 1D).

3.3 Nuclear accumulation of CML in the nuclei of renal tubular cells and in the whole kidney

Immunohistochemical analysis showed the presence of CML in the nuclei of renal tubular cells of both HHF- and LHF-fed groups (Fig. 2B and C). However, CML was not detected in the

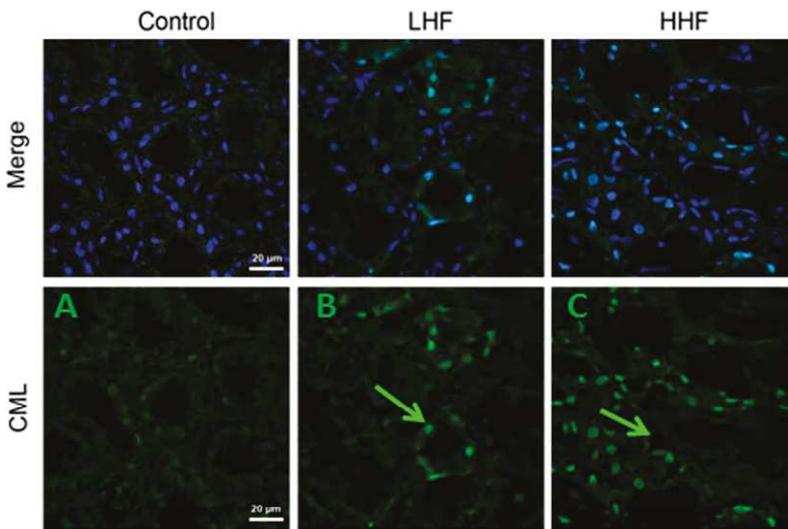


Figure 2. Nuclear accumulation of CML in kidney cells of IUGR piglets on PND54. CML immunolabeling in kidney sections of HHF- and LHF-fed animals compared to kidney section from a suckled control (left panel); CML (green labeling) was detected in nuclei of kidney cells of HHF- and LHF-fed groups.

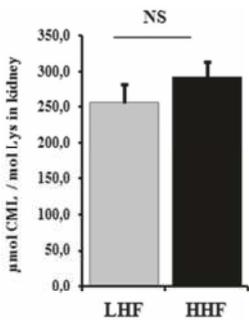


Figure 3. Determination of CML level in kidney samples of IUGR piglets on PND54. Kidney samples were used for CML determination using liquid chromatography coupled to linear ion trap tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Data are expressed as Mean \pm SEM. Significant difference (t-test) between HHF ($n=8$) and LHF ($n=8$) groups.

nuclei of renal tubular cells of suckled piglets (Fig. 2A). The total level of CML in the whole kidney measured by LC/MS-MS revealed a tendency of CML increase in the kidney of HHF animals compared with LHF animals (Fig. 3).

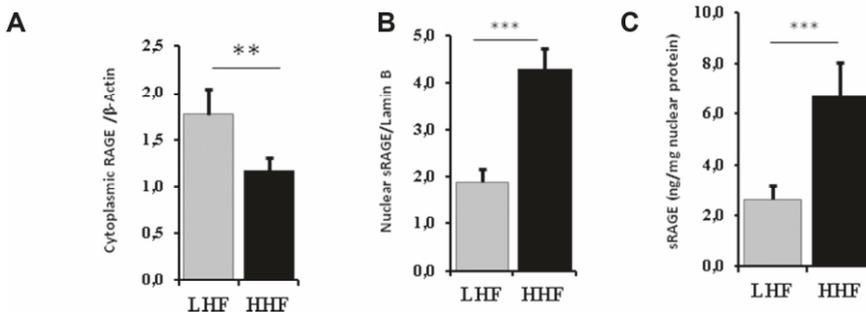


Figure 4. Determination of RAGE in kidney cells of IUGR piglets by Western blot and ELISA on PND54. Quantification of cytoplasmic and nuclear sRAGEs by Western blot (A and B) and ELISA (C). Data are expressed as mean \pm SEM. Significant difference (t-test) between HHF ($n=8$) and LHF ($n=8$) groups. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

3.4 Determination of RAGE in kidney cells

The presence of both membranous and nuclear RAGEs was confirmed by Western blot and ELISA (Fig. 4A–C). Results showed a significant increase of sRAGE, by both methods, in nuclear protein of HHF-fed versus LHF-fed animals ($p = 0.0019$; LHF 1.884 ± 0.2747 , $n = 8$ vs. HHF 4.288 ± 0.4474 , $n = 8$) and cytoplasmic RAGE was decreased in HHF-fed animals compared with LHF-fed animals ($p = 0.039$, Fig. 4A).

3.5 HHF diet promoted a pro-inflammatory, pro-apoptotic, and renin-angiotensin system (RAS) response

The expression of NF- κ B mRNA (Fig. 5A) and the protein's activation (Fig. 5B) were significantly enhanced by consumption of the HHF diet resulting in a pro-inflammatory response (Fig. 5A and B). In addition, the plasma levels of IL-18 were increased in the HHF-fed group compared with

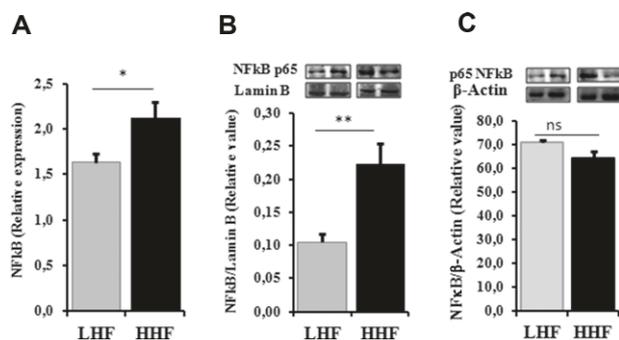


Figure 5. Activation of pro-inflammation state in the kidney cells of IUGR piglets after early exposure to HHF diet (PND54). NF- κ B at both mRNA (A) and protein (B and C) levels in kidney cells. Data are expressed as mean \pm SEM. Significant difference (*t*-test) between HHF ($n = 8$) and LHF ($n = 8$) groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

LHF-fed animals ($p = 0.0093$). Pro-apoptotic genes (caspase 3 and caspase 8) were significantly ($p = 0.036$; 0.77 ± 0.08 , $n = 8$ vs. 1.28 ± 0.17 , $n = 8$; $p = 0.036$; 0.82 ± 0.08 , $n = 8$ vs. 1.21 ± 0.12 , $n = 8$, respectively) upregulated (Table 3). A disruption of RAS genes was evidenced by a significant increase in the expression of AT1 and AT2 genes (Table 3).

3.6 HHF diet induced protein oxidation in kidney and lipid peroxidation in the liver of IUGR piglets

Oxidation of total protein was quantified by Oxyblot 1D method in renal extracts (Fig. 6A). MDA level was also measured in liver by HPLC (Fig. 6B). Consumption of the HHF diet induced a significant oxidation of total kidney proteins at PND54 ($p = 0.0057$; 2.496 ± 0.1960 , $n = 8$ vs. 3.596 ± 0.2765 , $n = 8$). Additionally, liver MDA concentration was increased (by 2.5-fold) in HHF-fed group compared with the LHF-fed group ($p = 0.0352$; 13.69 ± 4.753 , $n = 8$ vs. 34.01 ± 7.308 , $n = 8$).

Table 3. Relative expression of pro-apoptotic, pro-inflammatory, and RAS genes

Genes	LHF	HHF	<i>p</i> -Values
Caspase 3	0.77 ± 0.08	1.28 ± 0.17	0.036
Caspase 8	0.82 ± 0.08	1.21 ± 0.12	0.036
AT 1	0.64 ± 0.12	1.81 ± 0.37	0.010
AT 2	1.80 ± 0.28	3.04 ± 0.32	0.008
NF- κ B	1.63 ± 0.09	2.13 ± 0.16	0.018

Data are expressed as mean \pm SEM (*t*-test). Significant difference between HHF ($n = 8$) and LHF ($n = 8$) groups.

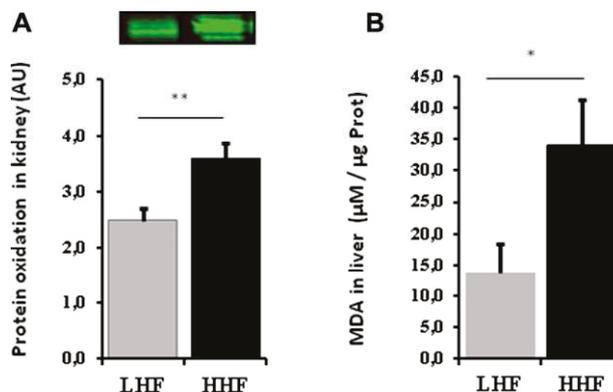


Figure 6. Activation of oxidative stress state in the kidney cells of IUGR piglets on PND54. Total renal proteins' oxidation level by Oxyblot 1D (A) and liver MDA level (B) in HHF and LHF groups. Data are expressed as mean \pm SEM. Significant difference (*t*-test) between HHF ($n = 8$) and LHF ($n = 8$) groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.7 HHF diet resulted in impaired renal development

Glomerular diameter (and therefore volume) was reduced in HHF-fed animals compared with LHF-fed animals ($p = 0.0396$; LHF 71.14 ± 0.9863 , $n = 8$ vs. HHF 64.57 ± 2.67 , $n = 8$). Plasma urea was significantly increased in HHF versus LHF animals ($p = 0.03$; LHF 1.76 ± 0.40 , $n = 8$ vs. HHF 3.63 ± 0.83 , $n = 8$; Table 4).

4 Discussion

The nutritional status encountered during critical periods of early life is an important determinant of normal development and maturation of the organism [21] and determines the health status later in life by several programming processes [22]. IF-fed babies are exposed to high level of AGEs generated by the heat treatment process that occurs during the formula production. It can be speculated that because AGEs are pro-oxidant molecules they can promote inflammation and oxidative stress that can either modify organ maturation or change cellular processes such that disease manifests during adulthood and contributes to the programming of kidney failure, which has been often described in people who were born with IUGR [14]. In this experiment, IUGR piglets received dAGEs as a result of consuming an IF that was manufactured using high temperature treatment and that contained a high level of CML. Chemical analysis of the heat-treated formula has shown that the level of CML is lower than the values reported for several commercial IFs [23] but it does exceed CML in human breast-milk by a factor of 670-fold [6, 24, 25]. Strikingly, early exposure to dAGEs induced an increase in plasma levels of free CML in the HHF-fed IUGR piglets, confirming that formula-derived AGEs are incorporated into the circulatory system [6]. When IUGR piglets were fed ad libitum solid diet,

Table 4. Plasma level of biochemical parameters measured on PND36

Biochemical parameters	LHF	HHF	p-Values
Glucose (g/L)	2.56 ± 1.64	1.74 ± 1.06	0,0508
Glycated hemoglobin (%)	3.74 ± 0.14	3.63 ± 0.14	0.700
Proteins (g/L)	37.57 ± 3.02	37.05 ± 1.93	0.7315
Albumin (g/L)	19.05 ± 2.77	17.58 ± 0.83	0.2425
Na ⁺ (mEq/L)	139.71 ± 1.01	140.86 ± 0.40	0.3168
K ⁺ (mEq/L)	4.43 ± 0.21	4.50 ± 0.12	0.7931
Creatinine (μmol/L)	110.50 ± 0.40	140.17 ± 46.81	0.0502
Urea (mmol/L)	1.76 ± 0.40	3.63 ± 0.83	0.00028
Triglycerides (mmol/L)	0.74 ± 0.51	1.00 ± 0.55	0.4112
Cholesterol	0.85 ± 0.03	1.084 ± 0.04	0.0035

Data are expressed as mean ± SEM (*t*-test). Significant difference between HHF (*n* = 8) and LHF (*n* = 8) groups.

no differences were observed in the levels of free CML in the plasma of both artificially fed groups.

Mericq et al. compared serum CML concentrations of 3- to 6-month-old babies and 12-month-old babies, and showed a 7.5% fold increase of AGEs levels in the serum of 3- to 6-month-old infants, suggesting that IF is the primary source of dietary CML in the blood [26]. Nevertheless, whether those formula loads of AGEs in early childhood initiate a postnatal programming state remains unknown.

In agreement with other studies [27, 28], we found the presence of a high level of excreted CML in feces indicating that heated formula is the principal source of these components. In rodents, Roncero-Ramos et al. report that fecal excretion of CML is strongly influenced by dietary CML levels and represents the major route of clearance [29].

The biological effects of AGEs are mediated through several cell-surface receptors; the best studied being the RAGE, multiligand receptor [30]. Structurally, RAGE has a single transmembrane domain followed by a cytosolic tail. The latter is critical for RAGE-induced intracellular signaling [31, 32]. Therefore, as for plasma CML, an increase level of plasma sRAGE was evident after the consumption of the high-heated formula indicating that the consumption of high level of derived AGEs may promote the synthesis of RAGE receptor. Findings in human and rodents suggest that a high level of RAGE and AGEs correlates with a high risk for several diseases, including diabetes and chronic kidney disease [26, 33–35]. Nevertheless, this relation remains still controversial, and further research is required [36, 37].

In the agreement with He et al. [38], we observed that CML was detected in the renal tissues of IUGR piglets on PND54. Specifically, this study is the first to detect the CML into the nuclei of renal tubular epithelial cells when animals reach the juvenile stage and are no longer consuming the heat treated formula but are consuming a solid diet. Interestingly, CML was not detected in kidney of naturally suckled piglets; strong evidence that the heated formula is the primary source of CML. To date, little is known about the subcellular localization of CML, however, an *ex-vivo* study in tissue from diabetic rats showed that BSA-AGE binds to the nuclei of renal tubular cells [39].

Heated IF contains a broad range of AGEs, in addition to CML, among them high and low molecular weight AGEs [40]. We speculate that these molecules after reaching the circulatory system are cleaved and may reach the cytosol. This could explain the high CML labelling detected in the nuclei of kidney cells. Another potential mechanism could be an increase in the permeability of nuclear pores during apoptosis which lead to the disruption of the nuclear-cytoplasmic barrier essential for CML to reach their nuclear targets [41].

When considering the detection of RAGEs in kidney cells, we observed the presence of both sRAGE and membrane RAGE isoforms, which is in agreement with the findings of several studies [42]. The level of nuclear sRAGE was increased in animals that received the high heat treated formula derived AGEs [43] while these animals also showed decreased expression of the cytoplasmic isoform. We hypothesize that this suggests a possible translocation of sRAGE into the cytosol. Due to its structure, sRAGE cannot propagate signaling events; instead, it contributes to AGE clearance and/or inhibits the AGE–RAGE interaction [44]. This activity may protect IUGR renal tubular epithelial cells against the toxicity of formula AGEs. Furthermore, because AGE and RAGE are charged molecules, they could activate a “depolarization” process of the nuclear membrane increasing its permeability and allowing the complex to reach the cytosol [45].

It should be noticed that a localization of RAGE in the nuclei was partially detected by immunohistochemistry procedures (results not shown). Further studies are under investigation to validate this hypothesis.

The consumption of the high heat treated formula is associated with a 10% decrease in glomerular diameter without any changes in glomerular density. One of the limitations of the study was the lack of histological data on kidney structure of non-IUGR animals, which may have enabled us to support our postulate that CML accumulation directly affects kidney structure integrity [46]. It is important to notice that the consumption of the HHF diet induced an elevation of urea level. Whether this rise in urea in the young pigs is associated with an impairment of glomerular filtration and/or a modification of protein catabolism remains to be determined.

Consumption of formula-derived AGEs exposes IUGR piglets to an elevated oxidative stress environment and as expected, we observed an increase in the total levels of oxidized proteins in kidney and lipid peroxide products of MDA in the liver. It has been shown that the oxidation of lipids and glucose results in accelerated AGE formation and the establishment of a pro-oxidative state [39, 47, 48]. Moreover, a concomitant expression of pro-apoptotic genes, target renin-angiotensin system genes, the expression and activation of NF- κ B, and the secretion of IL-18 are also observed, denoting pro-inflammatory and pro-oxidative actions of dAGEs [49, 50].

The present study provides *in vivo* evidence, in IUGR piglets, that formula-derived AGEs are absorbed into the circulation and represent biologically active molecules. Thus, providing AGEs in formula exposes IUGR piglets to an elevated oxidant stress state at a juvenile stage. A longer duration study would indeed be required to validate whether CML initiates changes that promote long-term kidney disease and subsequent increase risk of hypertension and cardiovascular diseases. Therefore, food processes controlling AGEs in IF are urgently needed and may be therapeutically relevant for premature and/or IUGR babies. These findings provide the background for more-detailed studies on the contribution of formula-derived AGEs to inflammation programming and kidney damage, as well as reference data for further preclinical studies, in the IUGR infant.

G.E. and L.A.N. conceptualized and designed the study, drafted the initial manuscript. L.A.N., G.E., D.M. and T.L. designed the data collection instruments. G.E., S.F., L.G., C.L., P.J., T.L., D.M. carried out the initial analyses and analysed the results. G.E., S.F., L.G., C.N.L., P.J., T.L., D.M., F.T. and L.A.N. reviewed and revised the manuscript, and approved the final manuscript as submitted. L.A.N. coordinated and supervised data collection at the three sites, critically approved the final manuscript as submitted.

The authors thank Dr. James A. Armitage (School of Medicine, Deakin University, Victoria, Australia), Professor Mustapha Rouis (UMR 8256 UPMC Université Paris 6-CNRS-INSERM), Professor Bertrand Friguet (UMR 8256 UPMC Université Paris 6-CNRS-INSERM), Dr. Ghoulane Fleury-Bahi (Laboratoire de Psychologie des Pays de la Loire LLPL EA4638), Dr. Monia Abdennebi-Boukthir (Children's Hospital, Department of Pediatrics "C", RU12SP09, Tunisia), and Samir Dou (EGEAL research unit) for assistance and Dr. Narges Bahi-Jaber and Dr. Thierry Aussenac (EGEAL research unit, LaSalle Beauvais) for comments. Funding was provided by Institut Polytechnique LaSalle Beauvais.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] World Health Organization, Geneva 2012.
- [2] Mandruzzato, G., Intrauterine growth restriction (IUGR): guidelines for definition, recognition and management. 2008, 14, 7–8.
- [3] Luyckx, V. A., Brenner, B. M., Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* 2005, 97, S68–S77.
- [4] Lucas, A., Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr.* 1998, 128, 401S–406S.
- [5] Baumann, M., Stehouwer, C., Scheijen, J., Heemann, U. et al., N epsilon-(carboxymethyl)lysine during the early development of hypertension. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1126, 201–204.
- [6] Sebekova, K., Saavedra, G., Zumpe, C., Somoza, V. et al., Plasma concentration and urinary excretion of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in breast milk- and formula-fed infants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1126, 177–180.
- [7] Schmidt, A. M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J. et al., Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 14987–14997.
- [8] Hudson, B. I., Carter, A. M., Harja, E., Kalea, A. Z. et al., Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *FASEB J.* 2008, 22, 1572–1580.
- [9] Cohen, M. J., Carles, M., Brohi, K., Calfee, C. S. et al., Early release of soluble receptor for advanced glycation endproducts after severe trauma in humans. *J. Trauma* 2010, 68, 1273–1278.
- [10] Uribarri, J., Cai, W., Peppas, M., Goodman, S. et al., Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2007, 62, 427–433.
- [11] Cai, W., Uribarri, J., Zhu, L., Chen, X. et al., Oral glycotoxins are a modifiable cause of dementia and the metabolic syndrome in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, 4940–4945.
- [12] Vlassara, H., Cai, W., Goodman, S., Pyzik, R. et al., Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009, 94, 4483–4491.
- [13] Uribarri, J., Peppas, M., Cai, W., Goldberg, T. et al., Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 42, 532–538.
- [14] Ojeda, N. B., Grigore, D., Alexander, B. T., Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.* 2008, 15, 101–106.
- [15] Attig, L., Djiane, J., Gertler, A., Rampin, O. et al., Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-weight piglets and effects of leptin supplementation on neonatal growth and development. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008, 295, E1117–E1125.
- [16] Attig, L., Brisard, D., Larcher, T., Mickiewicz, M. et al., Postnatal leptin promotes organ maturation and development in IUGR piglets. *PLoS One* 2013, 8, e64616.
- [17] Blat, S., Morise, A., Sauret, A., Louveau, I. et al., The protein level of isoenergetic formulae does not modulate

- postprandial insulin secretion in piglets and has no consequences on later glucose tolerance. *Br. J. Nutr.* 2012, *108*, 102–112.
- [18] Niquet-Leridon, C., Tessier, F. J., Quantification of N-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavored drink mixes using high-performance liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2011, *126*, 655–663.
- [19] Attig, L., Larcher, T., Gertler, A., Abdennebi-Najar, L., Djiane, J., Postnatal leptin is necessary for maturation of numerous organs in newborn rats. *Organogenesis* 2011, *7*, 88–94.
- [20] Cachon, B. F., Firmin, S., Verdin, A., Ayi-Fanou, L. et al., Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM_{2.5}) and PM(>2.5)) collected from Cotonou, Benin. *Environ. Pollut.* 2014, *185*, 340–351.
- [21] Raychaudhuri, N., Thamocharan, S., Srinivasan, M., Mahmood, S. et al., Postnatal exposure to a high-carbohydrate diet interferes epigenetically with thyroid hormone receptor induction of the adult male rat skeletal muscle glucose transporter isoform 4 expression. *J. Nutr. Biochem.* 2014, *25*, 1066–1076.
- [22] Negrato, C. A., Gomes, M. B., Low birth weight: causes and consequences. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2013, *5*, 49.
- [23] Delatour, T., Hegele, J., Parisod, V., Richoz, J. et al., Analysis of advanced glycation endproducts in dairy products by isotope dilution liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. The particular case of carboxymethyllysine. *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 2371–2381.
- [24] Dittrich, R., Hoffmann, I., Stahl, P., Muller, A. et al., Concentrations of Nepsilon-carboxymethyllysine in human breast milk, infant formulas, and urine of infants. *J. Agric. Food Chem.* 2006, *54*, 6924–6928.
- [25] Birlouez-Aragon, I., Locquet, N., de St Louvent, E., Bouveresse, D. J. et al., Evaluation of the maillard reaction in infant formulas by means of front-face fluorescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, *1043*, 308–318.
- [26] Mericq, V., Piccardo, C., Cai, W., Chen, X. et al., Maternally transmitted and food-derived glycotoxins: a factor preconditioning the young to diabetes? *Diabetes Care* 2010, *33*, 2232–2237.
- [27] Alamir, I., Niquet-Leridon, C., Jacolot, P., Rodriguez, C. et al., Digestibility of extruded proteins and metabolic transit of N epsilon-carboxymethyllysine in rats. *Amino Acids* 2013, *44*, 1441–1449.
- [28] Somoza, V., Wenzel, E., Weiss, C., Clawin-Radecker, I. et al., Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 2006, *50*, 833–841.
- [29] Roncero-Ramos, I., Delgado-Andrade, C., Tessier, F. J., Niquet-Leridon, C. et al., Metabolic transit of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food Funct.* 2013, *4*, 1032–1039.
- [30] Leclerc, E., Fritz, G., Vetter, S. W., Heizmann, C. W., Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, *1793*, 993–1007.
- [31] Schafer, B. W., Heizmann, C. W., The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 1996, *21*, 134–140.
- [32] Schmidt, A. M., Yan, S. D., Yan, S. F., Stern, D. M., The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 2001, *108*, 949–955.
- [33] Sebekova, K., Somoza, V., Dietary advanced glycation end-products (AGEs) and their health effects—PRO. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, *51*, 1079–1084.
- [34] Uribarri, J., Cai, W., Sandu, O., Peppia, M. et al., Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, *1043*, 461–466.
- [35] Birlouez-Aragon, I., Saavedra, G., Tessier, F. J., Galinier, A. et al., A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 2010, *91*, 1220–1226.
- [36] Wang, L. J., Lu, L., Zhang, F. R., Chen, Q. J. et al., Increased serum high-mobility group box-1 and cleaved receptor for advanced glycation endproducts levels and decreased endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products levels in diabetic and non-diabetic patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2011, *13*, 440–449.
- [37] Colhoun, H. M., Betteridge, D. J., Durrington, P., Hitman, G. et al., Total soluble and endogenous secretory receptor for advanced glycation end products as predictive biomarkers of coronary heart disease risk in patients with type 2 diabetes: an analysis from the CARDS trial. *Diabetes* 2011, *60*, 2379–2385.
- [38] He, C. J., Zheng, F., Stitt, A., Striker, L. et al., Differential expression of renal AGE-receptor genes in NOD mice: possible role in nonobese diabetic renal disease. *Kidney Int.* 2000, *58*, 1931–1940.
- [39] Gugliucci, A., Bendayan, M., Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 1995, *43*, 591–600.
- [40] Drusch, S., Faist, V., Erbersdobler, H.F., Determination of N-epsilon-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem.* 1999, *65*, 547–553.
- [41] Wu, J., Jiang, H., Luo, S., Zhang, M. et al., Caspase-mediated cleavage of C53/LZAP protein causes abnormal microtubule bundling and rupture of the nuclear envelope. *Cell Res.* 2013, *23*, 691–704.
- [42] Wendt, T. M., Tanji, N., Guo, J., Kislinger, T. R. et al., RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am. J. Pathol.* 2003, *162*, 1123–1137.
- [43] Song, F., Hurtado Del Pozo, C., Rosario, R., Zou, Y. S. et al., RAGE regulates the metabolic and inflammatory response to high fat feeding in mice. *Diabetes* 2014, *63*, 1948–1965.
- [44] Yan, S. F., Ramasamy, R., Schmidt, A. M., Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic

- disease and aging. *Biochem. Pharmacol.* 2010, 79, 1379–1386.
- [45] Xie, J., Reverdatto, S., Frolov, A., Hoffmann, R. et al., Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 27255–27269.
- [46] Bohlender, J. M., Franke, S., Stein, G., Wolf, G., Advanced glycation end products and the kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2005, 289, F645–F659.
- [47] Solhaug, M. J., Kullaprawithaya, U., Dong, X. Q., Dong, K. W., Expression of endothelial nitric oxide synthase in the postnatal developing porcine kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001, 280, R1269–1275.
- [48] Lin, L., RAGE on the Toll road? *Cell. Mol. Immunol.* 2006, 3, 351–358.
- [49] Ulrich, P., Cerami, A., Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm. Res.* 2001, 56, 1–21.
- [50] Cai, W., Gao, Q. D., Zhu, L., Peppas, M. et al., Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol. Med.* 2002, 8, 337–346.

Supplemental Material

Animal Management

Sixteen low birth weight (LBW) piglets from 5 sows were selected according to body weight and height as previously described¹. They were conducted under the mother until day 14 to allow colostrum and mother milk during the two postnatal life. At day 15, piglets were transferred into the experimental preclinical study of LaSalle Institute (France). The pigs were randomly divided into two groups of eight piglets and were individually housed in enriched environment. Prior to the experiment initiation, the piglets were given 3 days of acclimatization to observe their general health, and to ensure proper conduct of the study. From postnatal day 18 (PND18) to postnatal day 36 (PND36) piglets were fed with two different heated formula (HHF: heated formula at 120 °C during 20 minutes) and (LHF: heated formula at 37 °C during 5 minutes respectively). From PND36 to PND54, piglets remained on a normal *ad libitum* regular diet throughout the whole time of the experiment. To assess physiological status and evaluate the general condition of animals, weight measurements were performed weekly. Animals were scarified at PND54 by intraperitoneal injection of 90 mg/kg sodium thiopental (Nesdonal, Rhône-Mérieux, France). Plasma has been collected and kidneys were rapidly dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C for further experiments. Blood sampling and feces collect were performed on PND36 and PND54. Plasma and feces CML, hemoglobin, blood urea creatinine, nitrogen, cholesterol, glycemia, and triglyceride were measured at PND36 and PND54.

The levels of vitamin B1 has been measured (Eurofins, France) as an indicator of vitamin stability during the heating process. A temperature of 120 °C applied for 20 min has been chosen as the optimal condition for CML generation..

Chemical Analysis

For chemical analysis, products of high grade have been purchased from Sigma (Sigma Aldric, St. Louis, MO,USA) and Merck (Darmastad, Germany). CML and (D2)-CML were provided by PolyPeptide Laboratories France SAS (Strasbourg, France).

CML Determination

Sample preparation for CML and lysine analysis

Samples preparation were performed in triplicates according to the method by L ridon and Tessier ².

Kidney samples

Kidney samples were first lyophilized and grinded into homogeneous powder using a tissue lyzer (Eppendorff, USA). From each powder sample, 25 mg corresponding to 10 mg of total protein was treated with NaBH₄ (1 M) to stabilize the Amadori products. It was then dissolved in 2.5 mL of 6 M HCL and incubated at 110°C for 20h. From each acid hydrolysate, 300 µL was dried under vacuum and reconstituted in 300 µL of internal standard containing 0.25 µg of (D2)-CML (previously dissolved in NFPA 20mM). Liquid chromatography coupled to linear ion trap tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used for the CML analysis (ThermoFisher Scientific, Courtaboeuf, France).

Plasma samples

Plasma samples were collected at (PND36) and (PND54). They were stored at -20°C until CML analysis. One fraction of each plasma sample was tested for the total plasma CML (free and protein-bound CML) and the rest was used for the protein-bound CML determination after protein precipitation using 1.2 M trichloroacetic acid.

Formula samples

Prior the determinations of CML, proteins were extracted from formula samples. Briefly, 1 mL of reconstituted milk, 2 mL of absolute ethanol and 4 mL of dichloromethane were mixed. After centrifugation at 8000 x g for 10 min at 4°C, protein pellet was then analyzed using the validated LC-MS/MS method as previously described in CML determination section.

Feces samples

Collected fecal samples were lyophilized and grinded into homogeneous powder using a tissue lyzer (Eppendorff, USA). Thirty milligrams of fecal powder was treated like kidney

samples for CML analysis as previously mentioned. In addition—the nitrogen content was measured in lyophilized fecal powder by combustion using a LECO FP528 nitrogen analyzer according to the Dumas method. A conversion factor of 6.25 was used for the calculation of the protein content in pellets, which was expressed in g/100g of powder.

Analysis of vitamin B1 in Formula

Reconstituted heated milk samples were analyzed by Eurofins Nutrition Analysis Center for vitamin B1 content using HPLC technology (VILLE, France).

Biochemical parameters determination

Plasma levels of cholesterol, triglycerides, glucose, urea, creatinine, plasma proteins, K⁺ and Na⁺ were determined by routine approved assays (Beauvais Hospital, France).

Morphometric and immunohistochemical analysis of kidney tissues

Morphometric analysis of kidney tissues was established in collaboration with UMP 703 INRA Veterinary School of Nantes. After paraffin embedding, kidneys were sectioned (8 μm thick) and histological sections were stained using the protocol describes previously³. Histological measurements were made using image analysis software (Nikon Imaging Software).

Concerning renal tissue, nine glomeruli were selected for each sample. The number of nuclei was calculated for each glomerulus. The reproducibility of the measurement was estimated at 100% with a coefficient of reproducibility of 93.7%. The cell density (number of nucleus / μm²) was calculated. All glomeruli were analyzed for their surface area and minimum Feret diameter by software, NIS AR (Nikon). The coefficient of reproducibility of this method is 93.7%.

The detection of CML and RAGE was performed for the frozen sections of kidney samples. Using the protocol described previously⁴, immune-fluorescence technique was adapted using mouse monoclonal anti-CML (MAK<AGE> M-4G9-IgG 04, Microcoat Biotechnologie GmbH, Germany) and goat polyclonal Anti-RAGE (orb27365, Biorbyt, UK).

Protein extraction and immunoblotting

Kidney tissues were used for the protein extraction. Nuclear proteins were separated from cytoplasmic protein using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Kit (Thermo scientific Cat. 78833, France) according to the manufactures protocol. The protein were separated on 4-12% Tris-glycine gels (Invitrogen) bands were electrotransferred onto nitrocellulose membrane and blocked with 5% BSA in PBS/T buffet for 1 h at room temperature. After incubation of the membrane with NFkB primary polyclonal antibody (BS-0465R, Interchim, France) and goat polyclonal Anti-RAGE (orb27365, Biorbyt, UK) overnight followed by incubation with appropriate horseradish peroxidase-associated, secondary antibody before the signal was visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Bioscience). Beta-actin and Lamin B staining served as loading control.

Determination of sRAGE level

The level of sRAGE has been determined in plasma, extracted nuclear and cytoplasmic proteins using a porcine soluble receptor for RAGE ELISA kit (Life Sciences Advanced Technologies Cat. E07S0283, USA) according to the manufacturer's instructions.

Determination of kidney protein oxidation and liver MDA level

The detection of protein oxidation was performed by immunoblotting using the OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Millipore, Cat. S7150, USA) in collaboration with UMR 8256 UPMC Université Paris 6 -CNRS –INSERM Dept of Adaptation and Ageing Biology. The Bradford assay was used to determine the concentration of protein in the homogenized tissue. Samples were derivatized and loaded on electrophoresis gels in volumes calculated to give 10 µg proteins per sample and electrophoresed according to the manufactures instructions. Quantification of protein oxidation was achieved using Image J software. The level of malondialdehyde (MDA), an indicator of the lipid peroxidation of poly-unsaturated fatty acids, in liver and kidney samples was quantified by HPLC method adapted from Cachon et al⁵.

Quantitative RT-PCR

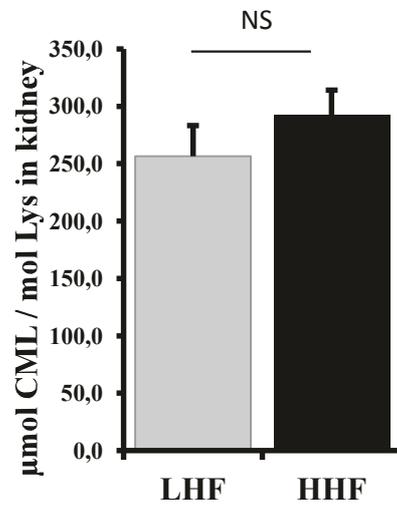
Total mRNA was extracted using RNeasy PLUS mini kit Cat.74134 (Qiagen, France). The cDNA produced by QuantiTect Rev. Transcription Kit (Cat. 205311, Qiagen, France) and the relative expression of studied genes was determined by RT-PCR (Rotor-Gene Q – Cyclor, Qiagen, France) using primer sequences summarized in Supplementary Table 2, normalized against PPIA **gene** (peptidyl prolyl isomerase).

Statistical analysis

All results were subjected to non-parametric Kruskal Wallis and *t-test* test using the GraphPad Software prism (version 5.02). For all analyses, the level of significance was set at $P < 0.05$. All values are expressed as means \pm SEM.

References

1. Attig, L. et al. Postnatal leptin promotes organ maturation and development in IUGR piglets. PLoS One 8, e64616 (2013).
2. Niquet-Leridon C & FJ, T. Quantification of Ne-carboxymethyl-lysine in selected chocolate-flavored drink mixes using high-performance liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry. (Food Chem, 2011).
3. Attig, L., Larcher, T., Gertler, A., Abdennebi-Najar, L. & Djiane, J. Postnatal leptin is necessary for maturation of numerous organs in newborn rats. Organogenesis 7, 88-94 (2011).
4. Labadie, K. et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. J Clin Invest 120, 894-906 (2010).
5. Cachon, B. F. et al. Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM(2.5) and PM(>2.5)) collected from Cotonou, Benin. Environ Pollut 185, 340-51 (2014).



Supplementary Figure 1: Level of CML in kidneys of piglets.

Levels of CML in the kidneys has been quantified by HPLC/MS-MS and the results showed a non significant ($p < 0.3309$) difference between the HHF group (256.4 ± 26.60 , $n = 8$) and the LHF (291.8 ± 22.16 , $n = 8$). Data are expressed as Mean \pm SEM.

Supplementary Table 1: Plasma level of biochemical parameters

Biochemical parameters	LHF	HHF	<i>p</i> -values
Glucose (g/L)	2.56 ± 1.64	1.74 ± 1.06	0,0508
Glycated hemoglobin (%)	3.74 ± 0.14	3.63 ± 0.14	0.700
Proteins (g/L)	37.57 ± 3.02	37.05 ± 1.93	0.7315
Albumin (g/L)	19.05 ± 2.77	17.58 ± 0.83	0.2425
Na ⁺ (mEq/L)	139.71 ± 1.01	140.86 ± 0.40	0.3168
K ⁺ (mEq/L)	4.43 ± 0.21	4.50 ± 0.12	0.7931
Urea/ Creatinine (mmol/L)	17.83 ± 2.22	26.72 ± 2.55	0.0304
Triglycerides (mmol/L)	0.74 ± 0.51	1.00 ± 0.55	0.4112
Cholesterol	0.85 ± 0.03	1.084 ± 0.04	0.0035

Supplementary Table 2: Primer pairs used for qPCR analysis

Genes	Sequences
Caspase 3	5' AGAATTGGACTGTGGGATTGAG 3' (F) 5' GAATTCGCCAGGAATAGTAACC 3' (R)
Caspase 8	5' AGACAGACTCAGAACAGACAGA 3' (F) 5' GCTTCGGTAAGAAACACAGTTG 3' (R)
AT 1	5' ACTCCGTCGACGCCATAAGTATGT 3' (F) 5' AGTGACCAGGCAGTGAGAAGCTTT 3' (R)
AT 2	5' TGGCCTGGATGGGTATCATTA 3' (F) 5' CAAAAGGAAGTGCCAGGTCAA 3' (R)
Angiotensin 1	5' TATGGTGCAGAAGGGCTGGAATGT 3' (F) 5' AGAGCTTGATGGAAGTGGAACTGC 3' (R)
eNOS	5' CGTTGGCCACTTCCTTAAACGTCT 3' (F) 5' GCCTCCAGAACTCTTTGCTTTGC 3' (R)
NF-kB	5' CCCATGTAGACAGCACCTATGAT 3' (F) 5' ACAGAGGCTCAAAGTTCTCCACCA 3' (R)
PPIA	5' TGGCCCAACACAAACG 3' (F) 5' TGCCATCCAACCACTCAGTCT 3' (R)

III.4 Travaux complémentaires

III.4.1 L'alimentation des animaux, mesures pondérales et évaluation de la prise alimentaire

Les quantités journalières de lait administrées aux porcelets ont été ajustées quotidiennement en fonction de leur poids et de leurs besoins de croissance. L'allocation laitière journalière par porcelet, en termes d'énergie digestible, était de 1200kJ/kg poids^{0,75} pendant les trois premières semaines (Morise et al, 2009). De plus, tous les jours, 50-200 grammes de starter ont été distribués à chaque porcelet pour pallier aux pertes en vitamine B1 et lysine causées par le traitement thermique.

Les quantités de lait distribuées sont les mêmes pour les deux groupes et sont réparties en 4 repas espacés de 6 heures, pendant 18 jours. Avant chaque distribution de lait, celui-ci est chauffé à 37°C pour mimer les conditions naturelles d'allaitement et éviter les troubles digestifs. Après le sevrage, les porcelets ont été nourris avec un aliment premier âge (porkisec extra) *ad Libitum*, pendant 17 jours jusqu'à l'euthanasie.

Le poids des porcelets est mesuré à raison de deux fois par semaine, pendant 3 semaines. Une courbe de croissance est tracée pour le suivi des performances du développement des animaux au cours de la phase d'allaitement et en post-sevrage. Les quantités du lait et de starter refusées ont été déterminées quotidiennement pour évaluer les quantités alimentaires ingérées par animal. Après le sevrage, les mesures de poids ont été établies deux fois par semaine tandis que la mesure du refus alimentaire a été déterminée quotidiennement.

III.4.2 Evolution du poids et du gain de poids des animaux au cours de la croissance

De la naissance jusqu'à la fin de la phase d'allaitement, les animaux des deux groupes ont présenté **un poids moyen comparable**. Lorsque les animaux ont été sevrés et ont reçu un aliment solide à volonté, une **différence significative du poids** a été observée entre les deux groupes ($p < 0,01$). Cette différence s'est maintenue jusqu'au sacrifice des animaux (J 54).

En dépit d'une absence de différence de poids et de la quantité de lait consommée au cours de la phase d'allaitement entre les deux groupes (Figure 24), le gain moyen quotidien au cours de la phase d'allaitement artificiel été significativement plus élevé au profit des animaux ayant reçu un lait non traité thermiquement (LHF) ($p < 0,01$). Cette différence pourrait être due à une diminution de l'efficacité alimentaire du régime hautement chauffé, associée à la perte de certains acides aminés, essentiels à la croissance du porcelet, comme la lysine (Figure 24) La distribution du starter, sous forme de complément solide, n'a probablement pas pu compenser totalement cette perte en acides aminés essentiels. Cependant, il faut souligner que cette différence de gain de poids a été transitoire et non observable en post-sevrage. A la fin de la période de croissance, nous avons constaté un écart de poids entre les animaux des deux groupes, sans doute lié à la baisse transitoire du gain de poids observée au cours de la phase d'allaitement. Il faut aussi souligner l'existence d'une importante variabilité individuelle du poids entre les animaux des deux groupes en période de post-sevrage (Figure 25).

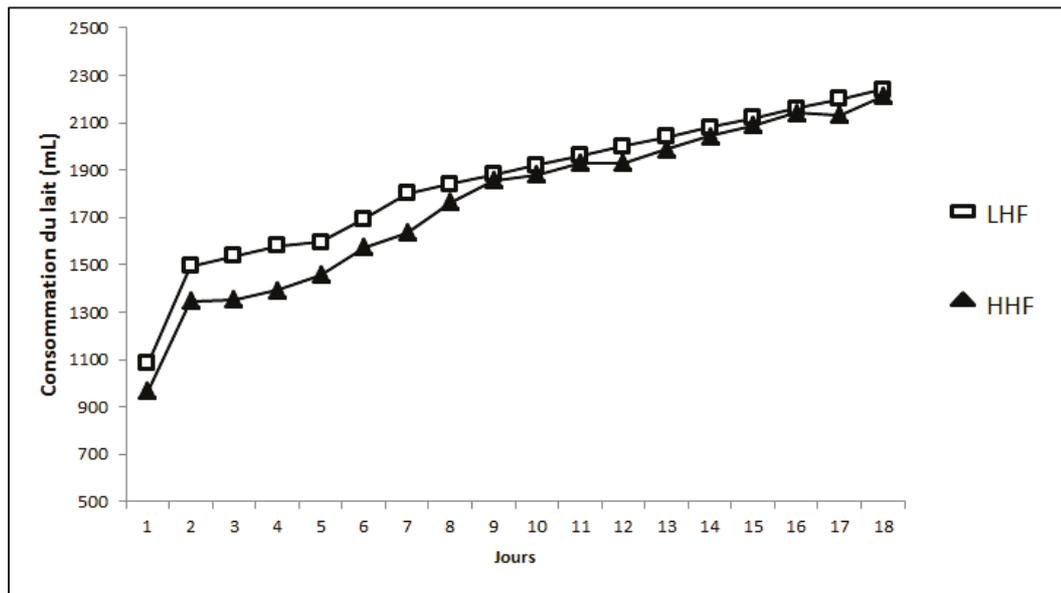


Figure 23 Courbe de la consommation moyenne de lait pendant la phase d'allaitement chez les deux groupes d'animaux LHF et HHF (n=15)

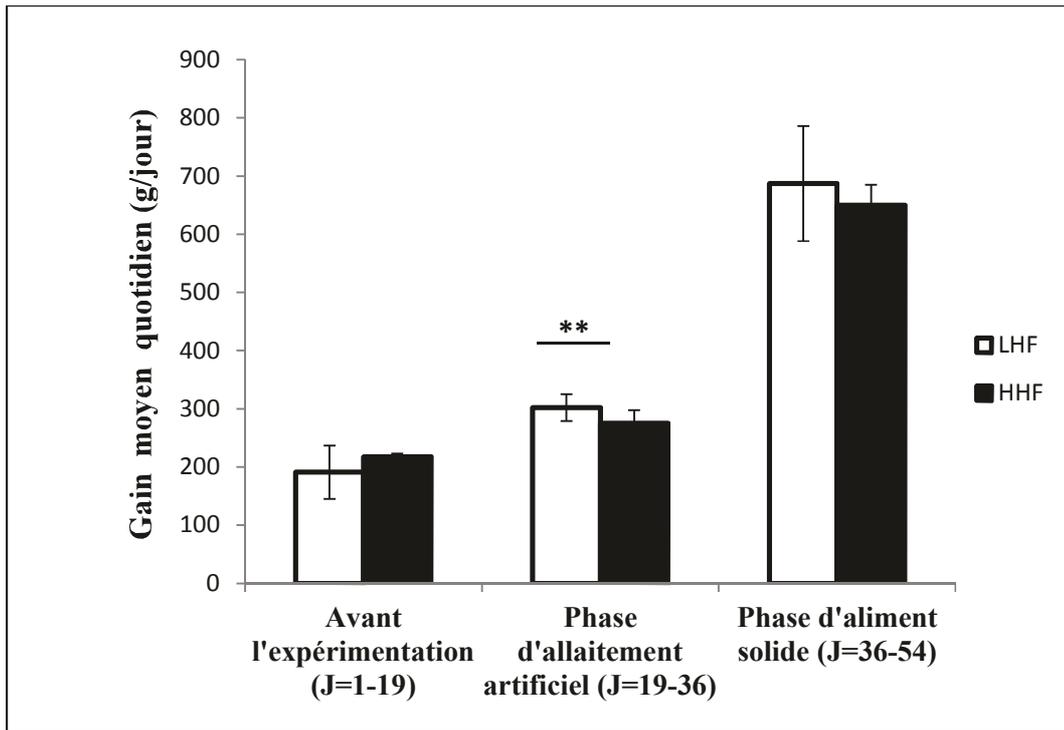


Figure 24: Evolution du gain moyen quotidien des animaux pendant les différentes phases d'expérimentation. Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm SEM. (** $P < 0,01$ Groupe LHF vs Groupe HHF). J = Age des animaux en jours. (n=15).

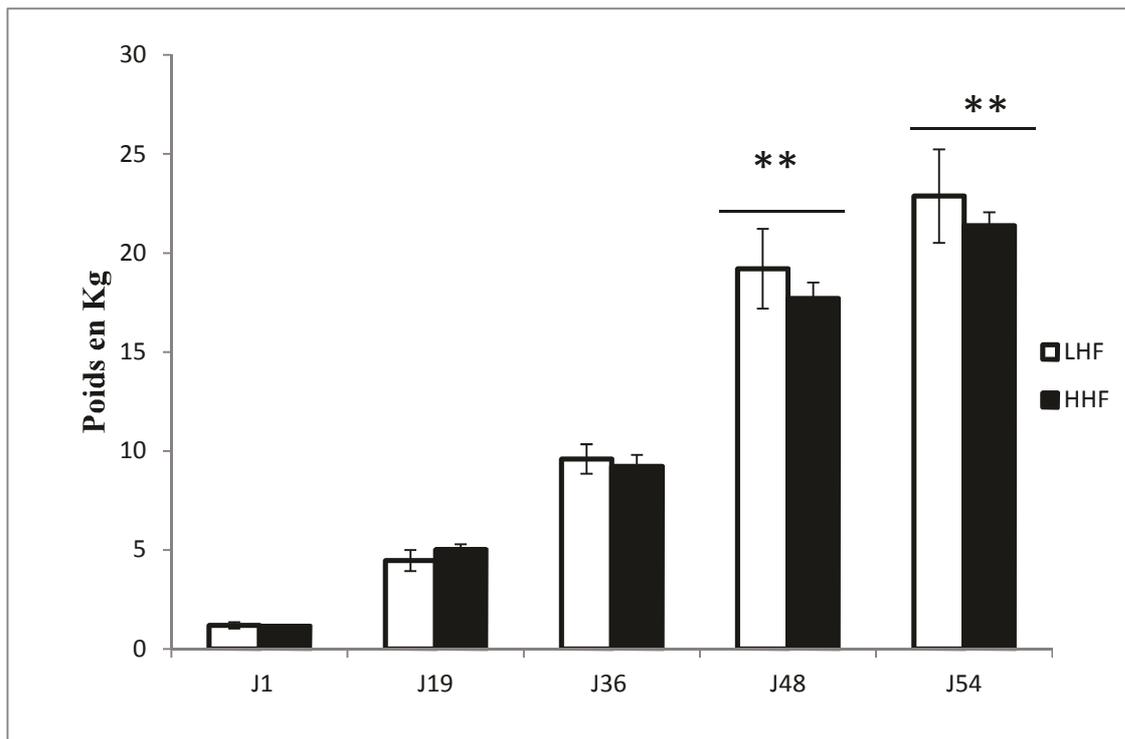


Figure 25: Evolution du poids des animaux pendant les différentes phases d'expérimentation. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. (** $P < 0,001$ Groupe LHF vs Groupe HHF). J = Age des animaux en jours. (n=15).

III.4.3 Impact des AGEs des formules sur la programmation développementale du stress oxydant hépatique chez le Porc RCIU

Tout comme le rein, le foie est un puissant organe de détoxification. Nous avons émis l'hypothèse que les AGEs issus des formules pourraient induire une toxicité hépatique et induire des phénomènes de stress oxydant au niveau de cet organe. Cette hypothèse a été fondée sur nos premiers résultats sur le rein mais aussi basée sur l'augmentation des produits de peroxydation lipidique (MDA) mis en évidence dans le foie des porcelets RCIU HHF «adultes». Le MDA est en effet un très bon marqueur du stress oxydant, et son augmentation pourrait traduire une «agression oxydative» initiée par la présence des AGEs. Comme dans le cas du rein, l'immaturation du RCIU le rend vulnérable, au niveau hépatique, à la présence de ces molécules pouvant réduire ses défenses antioxydantes. La mesure des ROS n'a pas pu être établie pour déterminer si ces molécules étaient responsables de l'installation de l'état pro-oxydatif-pro-inflammatoire observé au niveau de cet organe. En revanche, nous avons pu quantifier les protéines totales endommagées par oxydation (carbonylation) et mesurer à 54 jours d'âge, l'activité et l'expression des gènes des deux enzymes antioxydantes majeures, la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPX). Rappelons que ces deux enzymes antioxydantes sont impliquées dans le contrôle de l'homéostasie redox de l'organisme.

a) Matériels et méthodes

i) Mesure de l'activité de la SOD et de la GPX

Les échantillons de foie congelés à -80°C (250 mg) sont ont été broyés à l'aide d'un precllys lyser (bertin) puis un volume de 300µl de tampon phosphate (PBS, 50 mM) est

ajouté au broyat. Après homogénéisation, les échantillons sont centrifugés (4000 g, 10 min) et 240µl de surnageant sont collectés. Les activités du superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPx) sont mesurées dans les surnageants dilués au 20^{ème} au moyen de kits de dosage colorimétrique en appliquant les procédures proposées par le fournisseur (Cayman Chemical Company). Le dosage des activités SOD et GPx est réalisé dans une microplaque (96 puits) et l'absorbance est lue par un lecteur UV/visible aux longueurs d'onde respectives de 440 nm et 340 nm, respectivement. Les activités enzymatiques sont normalisées par rapport à la concentration des protéines totales (BCA protein assay kit, Sigma Aldrich).

ii) RT-PCR des gènes antioxydants Mn-SOD et GPX

Trente grammes de foie congelés sont déposés dans des tubes de 1,5 ml. Une bille de tungstène est ajoutée dans chaque tube et les tissus sont homogénéisés mécaniquement pendant une minute en les plaçant dans l'appareil Tissue Lyser™ (Qiagen©). L'ARN total a été extrait Les ARN extraits selon le protocole décrit dans RNAeasy extraction kit™ (Qiagen©). Des amorces deasignées pour l'amplification des gènes (Tableau 6).

Tableau 6 : Séquences des gènes d'intérêts SOD et GPX

Genès d'intérêt	Séquences des gènes d'intérêts
GPX	F: TGGATGAAGGATGGTGTG R: GATGATGCTGATGCTGA
Mn-SOD	F: TGGTCTCCTCTGACTTCAAC R: GTGAGGGTCTCTCTCTCCT

iii) *La quantification des protéines totales*

Après extraction et solubilisation, les protéines du foie quantifiées par la méthode de Bradford en utilisant la BSA comme standard. Les valeurs de la concentration des protéines sont présentées sous forme de moyennes à partir de 3 répliques techniques par échantillon. Après marquage des protéines carbonylées avec des sondes fluorescentes, les protéines dérivées du foie sont séparées par SDS-PAGE en gradient 4-20%. Ensuite, les protéines sont fixées dans le gel afin de révéler carbonylées par l'émission de la fluorescence à 530 nm. Les protéines totales sont marquées avec le SyproRubyTM et détectées par fluorescence différentielle à 595nm. L'analyse densitométrique de la fluorescence est obtenue grâce à l'utilisation du logiciel d'analyse Image J (NIH, USA). Le signal des protéines carbonylées est normalisé par rapport au signal obtenu avec les protéines totales pour chaque échantillon.

b) Résultats

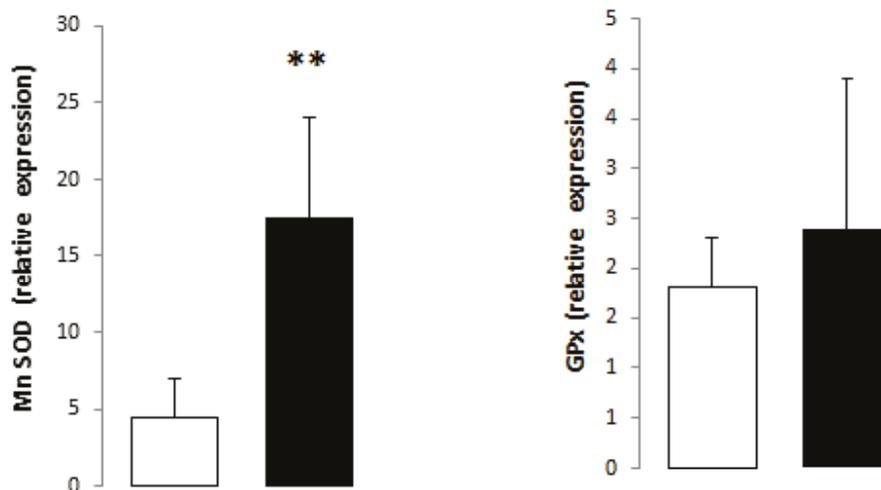
L'analyse de l'expression génique s'est basée essentiellement sur la Mn-SOD et la GPX. La Mn-SOD est une enzyme présente dans la mitochondrie. Son implication dans la génération des ROS et du stress oxydant induit par les AGEs est très probable. Les résultats montrent une différence significative ($P < 0,02$) de l'expression du gène SOD mitochondriale (Mn-SOD) chez les porcelets RCIU nourris avec la formule HHF comparés au groupe ayant reçu le régime LHF. Cependant, une tendance à l'augmentation de l'expression du gène GPX est observée chez les animaux du groupe HHF par rapport au groupe LHF.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'activité enzymatique de ces deux enzymes de défense antioxydantes. Les résultats concordent avec ceux de l'expression des gènes. En effet, seule l'activité de la SOD est significativement

augmentée ($P < 0.05$) chez les animaux ayant consommé la formule HHF, alors que l'activité de la GPX n'a pas été modifiée dans ce même groupe.

Il est connu que lorsque les acides aminés constituant une protéine sont oxydés, ils peuvent former un groupement carbonyle que l'on peut rechercher en quantifiant les protéines totales endommagées par oxydation (Rajendiran et al, 2015). Nous avons réalisé cette expérience en collaboration avec l'Equipe UMR-8256/INSERM REL U-1164 Adaptation Biologique et vieillissement B2A. Comme le montre la Figure 26, la comparaison du profil d'oxydation des protéines carbonylées au niveau hépatique n'indique pas des différences significatives pour ce paramètre entre les groupes expérimentaux LHF et HHF. Une tendance à l'augmentation des protéines carbonylées a été observée dans le groupe HHF. Les effectifs dans chaque groupe étant très faible ($n=5$), ceci pourrait aussi expliquer l'absence de significativité statistique entre les deux groupes d'animaux testés (Figure 27).

A



B

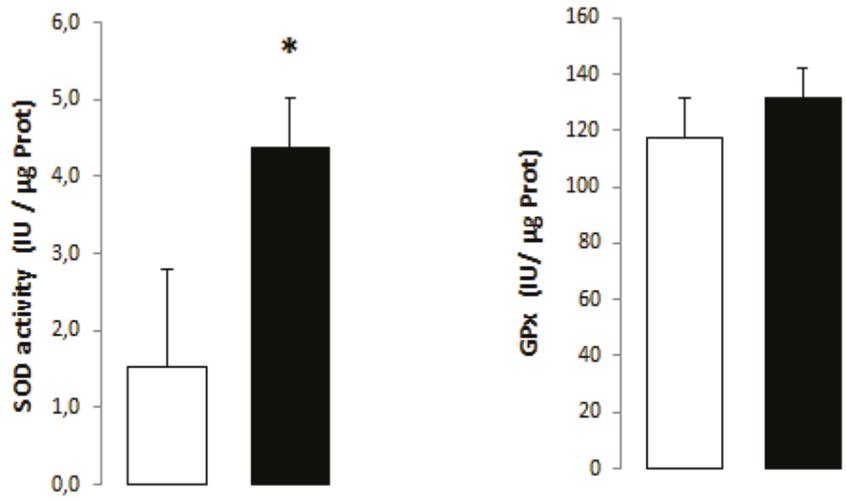


Figure 26 : Analyse de l'expression (A) et de l'activité (B) des enzymes antioxydantes hépatiques, la Superoxyde dismutase (SOD) et la glutathione peroxidase (GPx) chez les porcelets RCIU nourris aux formules faiblement chauffées LHF (□) ou fortement chauffées HHF (■). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM, *: $P < 0.05$ **: $P < 0.001$, HHF (n=8), LHF (n=8).

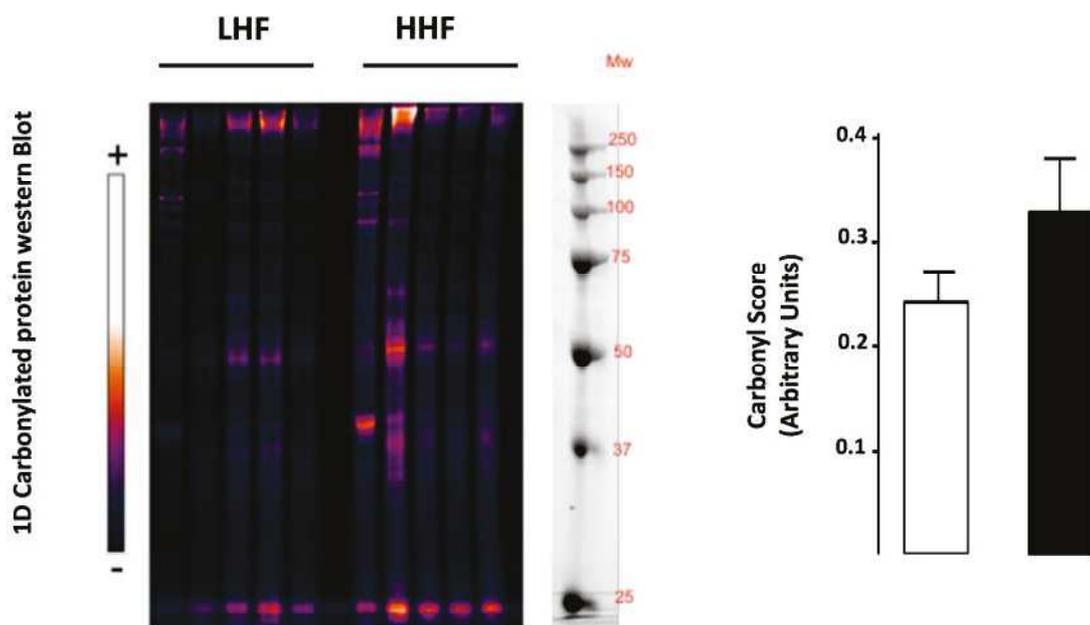


Figure 27 : Carbonylation des protéines totales au niveau du foie chez les porcelets RCIU - LHF (□) et HHF (■). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; HHF (n=5) et LHF (n=5).

c) Conclusion

Ces résultats préliminaires viennent confirmer l'état de stress oxydant observé au niveau rénal chez les animaux du groupe HHF. L'exposition des animaux à des teneurs élevées en AGEs a probablement induit la formation des ROS qui jouent aussi le rôle de facteurs de transcription (Wassmann et al, 2004) et qui peuvent ainsi activer la modulation de l'expression des gènes des enzymes anti-oxydantes telles que la Mn-SOD, le GPX et la CAT (catalase).

III.4.4 Travaux complémentaires In vitro

Au regard des résultats obtenus et de leur intérêt en particulier concernant la localisation de la CML dans les noyaux des cellules rénales et la présence des effets oxydants et pro-inflammatoires, nous avons décidé d'étudier les **mécanismes cellulaires** sous-jacents à cette modulation de la programmation de la fonction rénale par les AGEs des formules infantiles. Devant la **complexité du rein** (hétérogénéités structurale et fonctionnelle), il était difficile *in vivo*, de contrôler et de cerner les mécanismes cellulaires et biochimiques impliqués dans les phénomènes observés. En collaboration avec le laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire (EA 4667), SFR CAP-SANTE (FED 4132), UFR de Sciences, UPJV, Amiens, une étude complémentaire a été établie sur le modèle cellulaire HEK 293 (Human Embryonic Kidney, cellules embryonnaires rénales humaines). Par une approche de **siRNA**, nous avons bloqué le gène cible (RAGE) et mesuré l'effet d'une exposition des cellules aux extraits de deux formules infantiles traitées comme précédemment (HHF 20 min à 120°C et LHF 5min à 37°C) sur la viabilité cellulaire et la sécrétion de certaines cytokines inflammatoires. Des cellules dans les mêmes conditions ont également été exposées à la CML (contrôle positif). Dans le manuscrit, seuls les résultats de viabilité cellulaire seront présentés. Les résultats des études du profil cytokinique sont actuellement en cours de réalisation.

a) Matériel et méthodes

i) Culture cellulaire

Les cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) est une lignée cellulaire issue et immortalisée par une transformation de cellules rénales embryonnaires humaines. Ces cellules sont adhérentes et caractérisées par une morphologie épithéliale (Figure 28). Les HEK 293 sont largement utilisées pour leur facilité de transfection mais aussi pour leurs implications dans les études de toxicité.

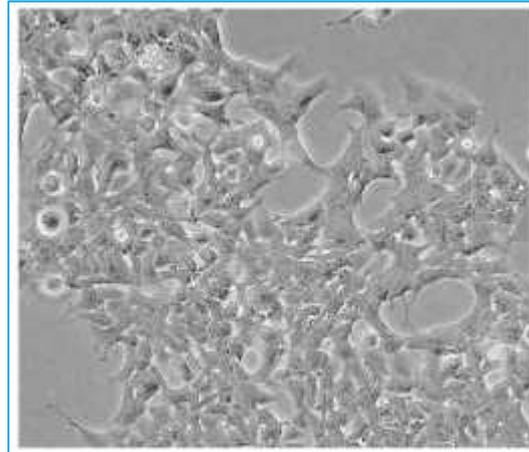


Figure 28 : Photographie de la lignée cellulaire .HEK293. (Source : site www.atcc.org)

Les cellules HEK293 sont cultivées dans du milieu EMEM (Gibco) supplémenté avec 10% de SVF (Gibco) et la gentamicine (10 mg/ml) (Invitrogen™). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C en présence de 5% CO₂. Lorsque les cellules sont confluentes, le milieu est enlevé et les cellules sont lavées avec 3 mL de PBS (Sigma Aldrich). Les cellules sont décollées en présence de 1 mL de trypsine (Gibco) après une incubation de quelques minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 3 ml de milieu EMEM/flasque²⁵ réchauffé préalablement à 37°C. Après numération cellulaire, une étape de centrifugation (6 min à 4°C) permet de récupérer les culots qui sont ensuite lavés avec du PBS. Les culots sont utilisés pour l'extraction des ARN et des protéines.

ii) Transfection des HEK 293 : Utilisation des « petits ARN interférents » (siRNA)

Les petits ARN interférents (siRNA pour small interfering RNA) sont de petits ARN double brin de 21-22 nucléotides générés à partir d'un long ARN double brin. Ils jouent un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions, en particulier l'inhibition post-transcriptionnelle des gènes via la destruction d'un ARNm cible pour empêcher l'expression de la protéine d'intérêt (Figure 29).

Techniquement, la transfection consiste à faire rentrer un «petit ARN» double brin d'environ 20 pb dans la cellule. Le siRNA s'associe à un complexe protéique en formant un nouveau complexe appelé RISC (RNA Induced Silencing Complex). Ce dernier induit la dissociation du siRNA double brin en simple brin. Le brin anti-sens appelé «guide» sera acheminé par le complexe RISC vers son ARNm cible complémentaire. En cas d'appariement parfait par homologie de séquence, l'ARNm sera détruit et il n'y aura pas de traduction. La destruction de l'ARNm induit une chute du niveau de la protéine d'intérêt.

Les transfections transitoires sont effectuées par nucléofection (nucleofector 2D, Amaxa, Lonza). Cette technique permet de rendre la membrane plasmatique perméable pendant un temps très court en créant un arc électrique.

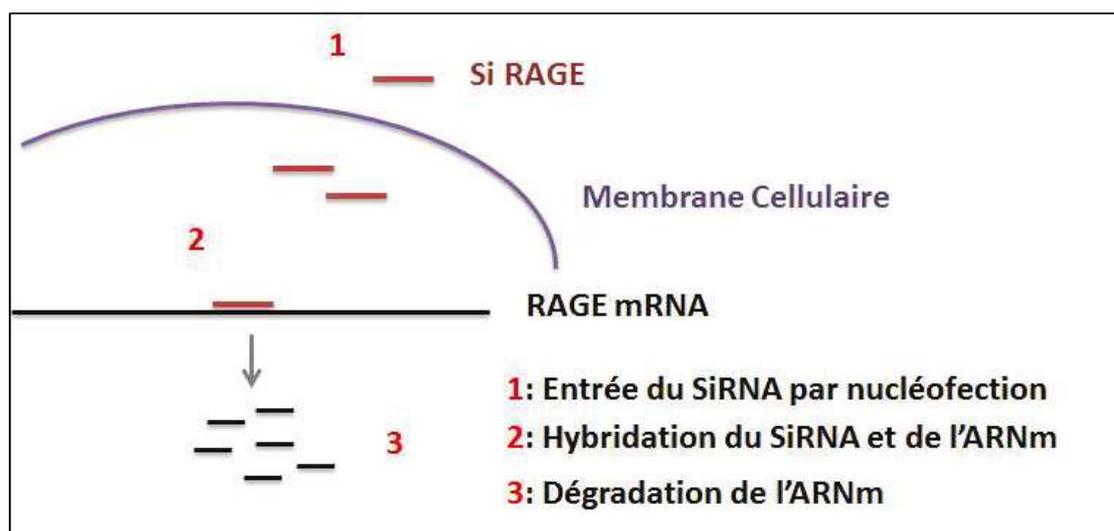


Figure 29 : Représentation schématique du mécanisme d'action d'un siRNA

La transfection nécessite des tampons de nucléofection spécifiques aux lignées cellulaires (nucleofector kit V, Amaxa). Après la phase de décollement avec la trypsine, 1 million de cellules sont récupérées pour chaque condition. Dans notre cas, deux conditions ont été nécessaires: une utilisant un siRNA contrôle ne touchant aucune séquence génique (siC, pour si Contrôle) et une autre, utilisant le siRNA ciblant les ARNm codant pour le RAGE (siRAGE). Les cellules sont centrifugées puis le culot est repris dans 100 μ L de tampon de nucléofection auxquels on ajoute 2 μ g de siRNA (contrôle ou cible).

Les cellules sont ensuite électroporées avec le programme Q-001. Enfin, les cellules sontensemencées selon les besoins de l'expérience dans leurs milieux respectifs.

Dans un premier temps, nous avons établi une cinétique pendant 24, 48 et 72h afin d'évaluer, par qPCR et Western Blot, le temps nécessaire pour obtenir une transfection optimale.

La deuxième étape a consisté à exposer les cellules HEK293 pendant 48 heures à un AGE pure, la CML à une concentration de 5 μ g/mL et à des extraits de formules infantiles faiblement chauffées (LHF dont la concentration en CML est égale à 0.3 μ g/mL) et fortement chauffées (HHF dont la concentration en CML est égale à 1.2 μ g/mL).

iii) Choix des doses de CML dans les filtrats

Nous avons délibérément choisi de stimuler les cellules HEK aux doses de 1.2 μ g/mL et 0.3 μ g/mL car elles correspondent au niveau de CML plasmatique des animaux après consommation des formules HHF et LHF respectivement (voir Figure 1 B article 1). Pour la CML pure, la concentration testée est bien plus importante que celle retrouvée dans les différents extraits laitiers (5 μ g/mL).

iv) Test de viabilité cellulaire : MTT

Afin de déterminer le nombre de cellules viables, nous avons utilisé le test MTT (Mosmann, 1983). Le principe de ce test est basé sur une transformation enzymatique du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan. L'enzyme responsable de cette transformation est appelée la succinate déshydrogénase (Figure 30). Les cristaux de formazan formés sont solubilisés puis détectés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. Le clivage se fait seulement dans les cellules vivantes. Ainsi, l'intensité de coloration est directement proportionnelle aux nombre de cellules vivantes. Dans notre cas, le test MTT est utilisé afin de comparer l'effet potentiellement toxique des AGEs (pure et ceux des formules infantiles) à celui des cellules témoins transfectées ou non.

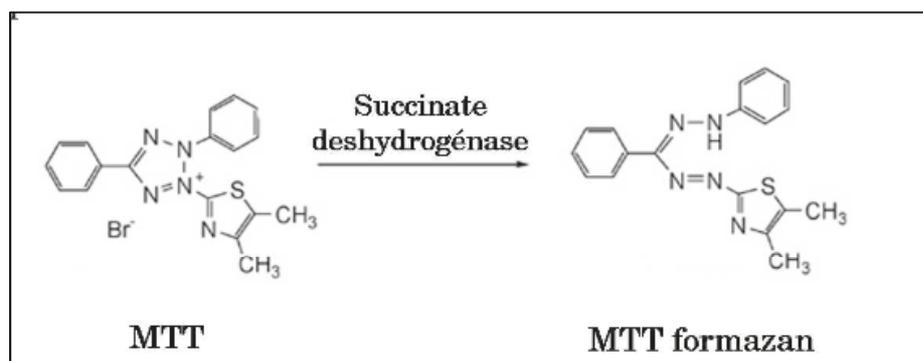


Figure 30 : Principe du test de viabilité cellulaire MTT.

v) *Extraction des ARN totaux au Trizol :*

Après 48h d'exposition à la CML ou aux extraits des formules, les ARN totaux sont extraits en utilisant la méthode standard d'extraction au thiocyanate de guanidium. Une bille

de tungstène est ajoutée dans chaque tube et les cellules sont homogénéisées mécaniquement pendant une minute en les plaçant dans l'appareil Tissue Lyser™ (Qiagen©). Les échantillons sont homogénéisés dans 1ml de Trizol pour 10⁶cellules. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 5 minutes à température ambiante puis 0,2ml de chloroforme pour 1ml de Trizol sont ajoutés, inversés pendant 15 secondes et incubés pendant 2 à 3 minutes à température ambiante. Par la suite, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g durant 15 minutes à 4°C. Un volume de 300µl de tampon phosphate (PBS, 50 mM) est ajouté au lysat. Après homogénéisation, les échantillons sont centrifugés (4000 g, 10 min).

Après centrifugation, le mélange est séparé en 3 phases distinctes: une phase inférieure rouge, une interphase de phénol-chloroforme et une phase aqueuse supérieure contenant l'ARN. Par la suite, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et les ARN sont précipités avec 0.5ml d'isopropanol pour 1ml de Trizol. S'ensuit une incubation de 10 minutes à température ambiante puis une centrifugation à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1ml d'éthanol à 75% pour 1ml de Trizol. Après une dernière centrifugation à 7500 g pendant 5 minutes à 4°C, les culots sont resuspendus dans de l'eau « nuclease free » (Qiagen), soit dans 30µl environ pour xx cellules. Les ARN extraits sont quantifiés et analysés en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Le ratio A260/A280 est déterminé pour chaque échantillon pour estimer la pureté des ARN. Seuls les échantillons dont le ratio est compris entre 1,9 et 2,1 sont analysés.

vi) Transcription inverse (RT)

Les ARN extraits de chaque échantillon sont «reverse» transcrits en ADNc selon le protocole du Quantitech Reverse Transcription Kit™ (Qiagen©). L'ADNc est ensuite stocké

à -20°C. La concentration et la pureté de l'ADN sont analysées avec le spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)

L'amplification de l'ADNc est réalisée avec du SYBR Green dans un mélange réactionnel (20µl) contenant 15 µl de prémix (composé de 10 µl de SYBR Green Master Mix (Qiagen©), 4µl de H₂O RNAase free, 0,5µl de chaque amorce (Tableau 7) (concentration finale de 0,3µM) et 5µl d'ADNc (100ng). Un témoin négatif est incorporé pour chaque changement de mélange de réaction. Les analyses PCR quantitative en temps réel sont effectuées en utilisant le «Rotor Gene QTM ». Le programme consiste en un maintien de la température de 95°C pendant 5 minutes, suivi par 40 cycles à 95°C durant 10 secondes et un maintien à 60°C pendant 30 secondes. A la fin des cycles, la courbe de fusion est analysée pour vérifier la spécificité des amorces et l'absence de contaminations ou la formation de dimères d'amorces

Gène / ARNm	Séquences des oligonucléotides (5'-3')
RAGE NM_001136.4	F:TGGATGAAGGATGGTGTG R: GATGATGCTGATGCTGA
GAPDH NM_002046.4	F: TGGTCTCCTCTGACTTCAAC R: GTGAGGGTCTCTCTTCTCCT

Tableau 7 : Les séquences des oligonucléotides utilisées pour la PCR quantitative

vii) Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique est réalisée en utilisant le logiciel Prism GraphPad (2005). Une analyse de la variance est utilisée, suivie d'un test de comparaison des moyennes. Les données sont représentées en moyenne +/- SE. Le seuil de significativité est fixé à $p < 0.05$.

b) Résultats

i) Efficacité de la transfection et expression du RAGE par RT-PCR

Dans un premier temps, l'efficacité de la transfection des cellules HEK293 avec le siRNA (si RAGE et si Contrôle), a été vérifiée par qPCR en effectuant une cinétique pendant 24, 48 et 72h d'incubation.

Comme le montre la Figure 31, les résultats obtenus pour un temps d'exposition de 48h sont concluants. Ainsi, le blocage du RAGE est presque total (90 %). Après 72h d'exposition, les résultats obtenus montrent que le récepteur RAGE est autant exprimé dans les cellules traitées aux siRNA que dans les cellules contrôles. La dégradation des siRNA après 72h d'incubation pourrait expliquer ce résultat.

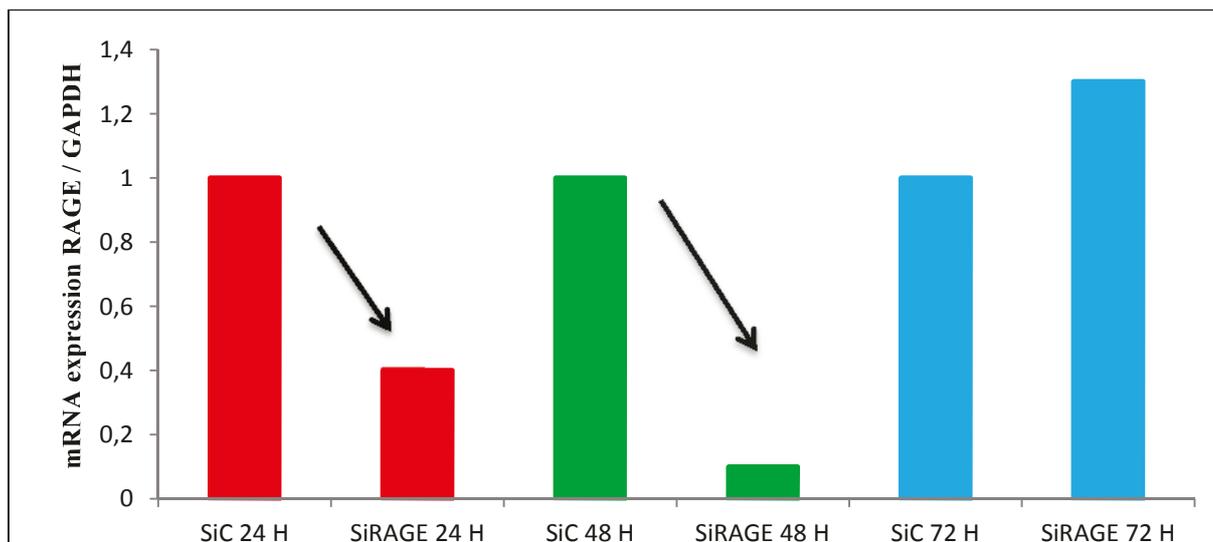


Figure 31 : Cinétique de la transfection des HEK 293 : Les cellules ont été incubées avec le siRAGE (2 μ g) pendant 24, 48, et 72H à 37°C.

ii) Effet des AGEs sur la viabilité cellulaire

1. Au vu des résultats de la transfection, la viabilité cellulaire des HEK293 (test MTT) après exposition à la CML pure et aux filtrats des formules HHF et LHF est mesurée à 48 h uniquement. Les résultats préliminaires de cette étude sont résumés comme suit : Le blocage du récepteur RAGE s'accompagne d'une baisse d'environ 50% de la viabilité cellulaire. Ce résultat montre que le récepteur RAGE joue un rôle important dans la prolifération des cellules embryonnaires HEK293.
2. L'exposition à la concentration de 5 μ g/mL de CML ne modifie pas la viabilité des cellules contrôles et des cellules transfectées avec le siRAGE (Figure 32).
3. Dans les conditions contrôles, nous avons observé observons une augmentation importante de la viabilité cellulaire en présence des extraits LHF (7 fois plus, Figure 33 A) et HHF (3 fois plus, Figure 33 B) par comparaison avec les cellules non exposées. Des effets apoptotiques de certains composés issus des filtrats hautement chauffés pourraient expliquer cette différence de niveau de prolifération entre les deux conditions testées.

4. Dans les conditions d'inactivation du RAGE, il n'y a aucun effet des extraits des deux formules sur la prolifération cellulaire. Le pourcentage de prolifération des cellules est comparable à celui obtenu dans les conditions de non-stimulation. Ces résultats attestent que les effets prolifératifs observés avec les deux extraits sont médiés par le récepteur RAGE.

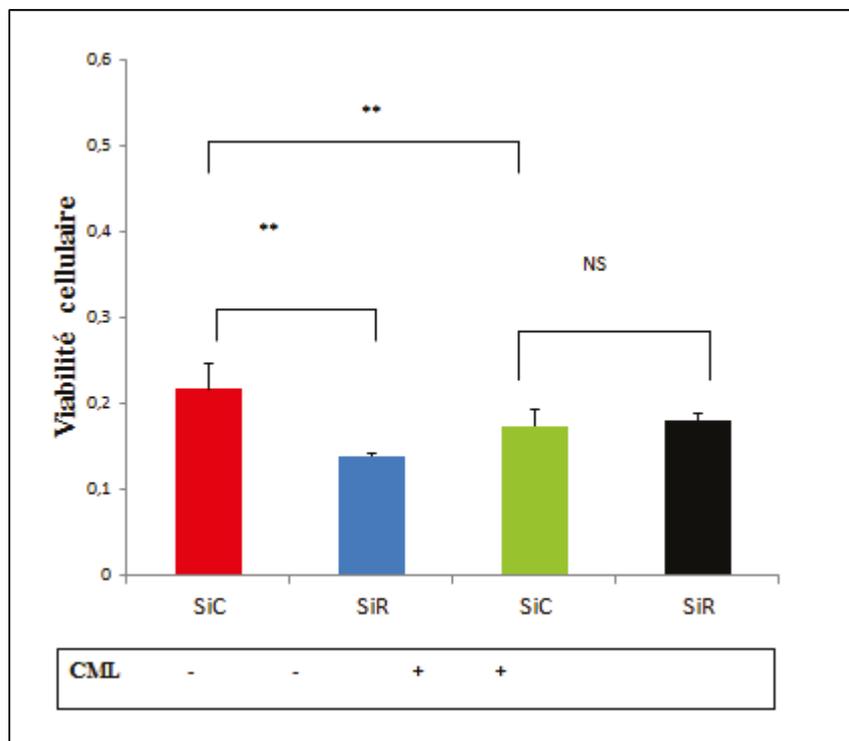
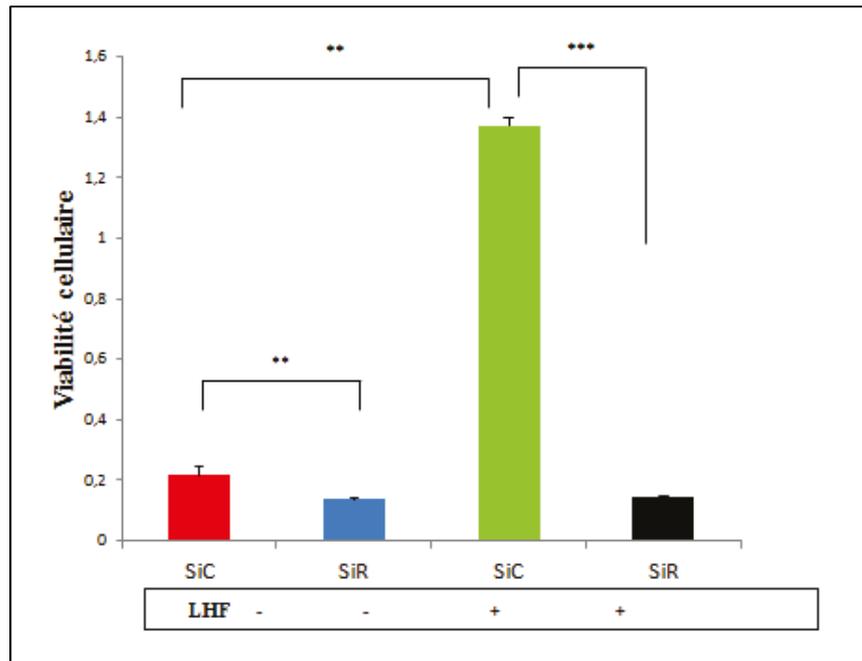


Figure 32 : Effet de la CML sur la viabilité des cellules HEK :. Les cellules transfectées (siC et siRAGE) et ont été incubées pendant 48h à 37°C, en présence ou en absence de la CML (5 µg/mL). Le test MTT montre qu'en bloquant le RAGE, aucun effet significatif de la CML sur la prolifération cellulaire n'est observé. Dans les conditions contrôles, on note une augmentation de la viabilité cellulaire avec la CML. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± S.E.M. (** P < 0,001 Groupe LHF vs Groupe HHF.) (n=8).

A



B

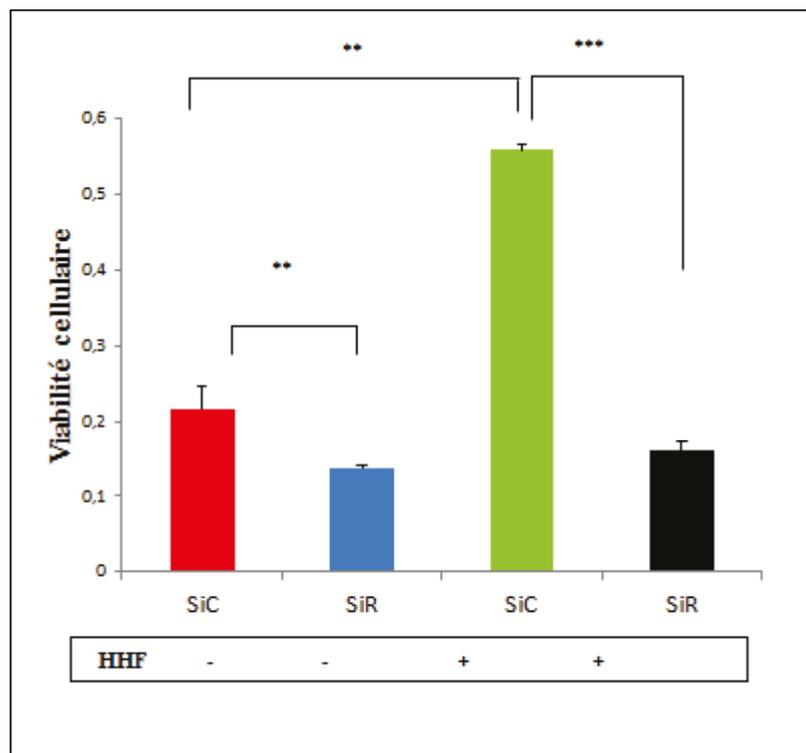


Figure 33 : Effet des extraits de la formule fortement chauffée (HHF) (A) et faiblement chauffée (LHF) (B) sur la viabilité des cellules HEK 293.. Les cellules transfectées (siC et siRAGE) ont été incubées pendant 48h à 37° C en présence ou en absence des filtrats des formules (LHF et HHF) dont les concentrations de la CML sont de 1.2 µg/mL et 0.3 µg/ mL, respectivement).. Les résultats obtenus par qPCR montrent qu'après 48H d'incubation, les filtrats LHF et HHF augmentent la viabilité cellulaire, ; celle-ci se trouve fortement inhibée en absence du RAGE. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± S.E.M. (***P <0,0001 ; ** P < 0,001Groupe LHF vs Groupe HHF).) (n=8).

c) Conclusion

Les extraits des laits HHF et LHF semblent avoir un effet prolifératif sur les cellules HEK293, avec une augmentation de la viabilité cellulaire en 48 heures d'exposition, soit environ 3 à 7 fois plus respectivement. La CML, en revanche, n'a aucun effet prolifératif ou toxique sur les cellules HEK293.

Ainsi d'après ces résultats, il semblerait que dans les extraits des formules LHF et HHF, il existe des composés qui stimulent la croissance des cellules en conditions contrôles (sans inactivation du récepteur). Cet effet est beaucoup plus important avec les extraits provenant des formules LHF qui contiennent moins de produits de glycation et de composés toxiques pour la cellule. En revanche, lorsque le récepteur RAGE est inactivé, cet effet prolifératif disparaît, ce qui dénote l'implication du RAGE dans ce processus. Il n'est pas exclu que les effets observés sur la prolifération cellulaires pourraient être le reflet d'une surexpression du récepteur RAGE dont les effets prolifératifs propres sont mis en évidence dans les conditions basales (sans stimulation).

L'implication du récepteur RAGE dans la prolifération de certains types cellulaires a déjà été démontrée au travers de quelques études. Ji et al (2015) ont montré que l'inactivation du récepteur RAGE, par l'approche virale, permet de bloquer la liaison du récepteur à ses ligands et ainsi de limiter d'importants phénomènes prolifératifs impliqués dans la polykystose rénale (Lee et al, 2015a).

Tagushi et al (2000) ont montré que le blocage de la voie de signalisation du RAGE est également une approche utilisée pour limiter la croissance de certaines tumeurs et métastases (Taguchi et al, 2000). Ainsi, une étude récente *in vitro* (Serban et al, 2015) menée sur des cellules HEK 293 a démontré des effets cytotoxiques des AGEs glyqués. En effet, l'incubation pendant 12h de ces cellules avec les AGEs glyqués a induit une surexpression de l'IL6, de HSP 27 et également une augmentation de l'activité antioxydante de la CAT. Cependant, après 24h d'incubation les une augmentation significative du taux de MDA et un effet inflammatoire important a été révélé. Cette inflammation est médiée par la surexpression

de NF- κ B p65, RAGE, HSP 70, et également par un taux élevé des cytokines inflammatoires. Ces résultats suggèrent l'importante implication du RAGE dans l'activation de NF κ B et l'induction d'un état inflammatoire des cellules HEK.

Les effets prolifératifs mis en évidence dans cette étude semblent liés à l'activation des voies de signalisation p44/p42, p38, SAP/JNK MAPK. Le dosage des cytokines inflammatoires (en cours) et l'étude de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose nous permettront de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans ces processus de prolifération. De même, il est envisagé de poursuivre ces études en analysant par qPCR et Western blot l'expression de certains marqueurs du stress oxydant dans les différentes conditions étudiées.

**CHAPITRE IV: Effet des AGEs des
formules sur la
programmation du stress
oxydant et de l'inflammation
au niveau colique: focus sur
l'implication du microbiote
intestinal : Article 2**

**Probiotic effects and antioxydant capacities of formula derived AGEs
in colon of IUGR juvenile pigs, ELMHIRI G., et al, Journal of Radical
Biology & Medecine (soumis).**

IV.1 Introduction

Dans le chapitre précédant nous avons observé que la consommation de formules hautement chauffées induisait une élévation du taux de CML dans le sang et l'installation à long terme d'un stress oxydant dans les principaux organes d'élimination à savoir le rein et le foie. Une grande partie des AGEs contenus dans les formules échappe à la digestion et se retrouve confinée dans le compartiment colique où elle est métabolisée par les bactéries. Cette dégradation des AGEs par les bactéries pourrait contribuer à la formation de produits de fermentation : certains d'entre-eux pourraient être une source de formation de radicaux libres, et de peroxydes et contribueraient à l'installation du stress oxydant (Chuyen, 2006). D'autres catalysent la production des mélanoidines (Reynolds, 1965) dont les effets antioxydants ont été largement démontrés (Rurian-Henares & Morales, 2008).

Dans ce contexte, et au regard du microbiome immature du RCIU, nous nous sommes posés la question de savoir si la consommation de la formule riche en CML modifierait le profil microbien précoce des animaux et si une telle modification modulerait tardivement l'expression et l'activité de certaines enzymes clés du système anti-oxydant.

Des travaux très élégants ont montré que la modulation précoce du microbiote intestinal a des conséquences à long terme sur la santé (Cox et al, 2014; Schokker et al, 2015). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'étude de l'impact de la consommation des formules riches en AGEs sur:

1. La composition du microbiote et son évolution en fonction de l'âge chez le porcelet RCIU
2. Le stress oxydant, l'inflammation et l'activité des enzymes clés du système anti-oxydant.

Une partie des résultats de ce travail est présentée sous la forme d'une publication actuellement soumise dans le journal « Free Radical Biology and Medicine ».

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale au 12th ISMR-International Symposium on the Maillard Reaction qui s'est tenue à Tokyo du 4 au 7 septembre 2015.

IV.2 Résultats marquants

Les résultats de cet article montrent que la consommation de la formule laitière hautement chauffée a entraîné, au cours de la période d'allaitement artificiel, une diminution significative de la diversité bactérienne (exprimée par la baisse de l'indice de Simpson). Nous avons également constaté, qu'au même stade, les animaux du groupe HHF ont une plus grande proportion des populations de Bifidobactéries, de Lactobacilles et des Entérobactéries. Une prédominance du phyla des Bacteroïdites est également observée. Ainsi, il semblerait que la consommation de la formule HHF a induit un effet probiotique et /ou prebiotique «like». Ces modifications du microbiote précoce sont associées à une modulation du microbiote du jeune adulte qui est dominé par une large proportion des bactéries appartenant au phyla des Bacteroïdetes. Ces résultats suggèrent que la consommation de fortes teneurs en AGEs au cours de la période postnatale module le microbiote du jeune adulte. De plus des modifications importantes de l'expression de plusieurs enzymes anti-oxydantes, de l'activité de la GPX, et de l'expression du facteur iNOS sont observées à l'âge de 54 jours. En revanche, aucune modification de l'oxydation totale des protéines ni de l'expression du facteur pro-inflammatoire NF-kB au niveau du colon n'ont été observés dans les deux groupes d'animaux. L'ensemble de ces résultats dénotent que la forte consommation des AGEs pendant la période postnatale, a permis la mise en place d'un processus de programmation du système de défense anti-oxydant pour permettre aux porcelets RCIU de contrecarrer les effets nocifs des produits de glycation alimentaires ingérés lors de leur développement et dont les

effets pro-oxydants ont été discutés dans le chapitre 1. Les mécanismes antioxydant impliquant les bactéries sont inconnus et méritent d'être approfondis.

IV.3 Retour sur la méthode CE-SSCP

Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux méthodes différentes et complémentaires pour analyser le microbiote colique des animaux. La méthode de CE-SSCP et la méthode de qPCR. Le descriptif détaillé de ces approches figure dans l'article 2. Dans cette partie, nous apportons quelques brèves informations supplémentaires sur l'approche CE-SSCP, mise en place au laboratoire. Cette approche nous a permis de caractériser le microbiote intestinal global. L'analyse des spectres de la CE-SSCP et l'interprétation des résultats ont été réalisées conjointement avec l'aide de Samir DOU, doctorant dans l'unité EGEAL.

Bref résumé de la méthode SSCP utilisée

La CE-SSCP est une méthode d'empreinte moléculaire robuste et reproductible qui a été appliquée pour étudier l'écologie microbienne de nombreux écosystèmes appartenant à des environnements variés comme le tube digestif, le sol, la mer (Zinger et al, 2007). Cette méthode est basée sur la mise en évidence de la variabilité de la composition des amplicons d'un marqueur de diversité (souvent le gène codant pour l'ARN 16S).

La migration des empreintes moléculaires est réalisée dans des capillaires gérés par un séquenceur. Cette technique est plus rapide et moins coûteuse que les techniques classiques en gel (RFLP, TTGE...). Cependant elle ne permet pas de récupérer les bandes du gel afin de les séquencer dans le but de faire de l'affiliation phylogénétique (Costa *et al.*, 2006 ; Mohr & Tebbe, 2000).

Résumé du principe général de la CE-SSCP

Les simples brins d'ADN en conformation tridimensionnelle sont déposés dans un capillaire par électrocinétique. Un potentiel électrique est appliqué à chaque extrémité du capillaire ce qui provoque la migration électrophorétique des simples brins. La forme et la taille de la conformation de chaque brin vont donc être à l'origine d'une migration différentielle: les grosses structures migrent moins loin que les petites structures. Un scanner associé à un laser capte l'intensité de fluorescence sur toute la tête de lecture et produit un chromatogramme. La Figure 34 résume les principales étapes de la CE-SSCP.

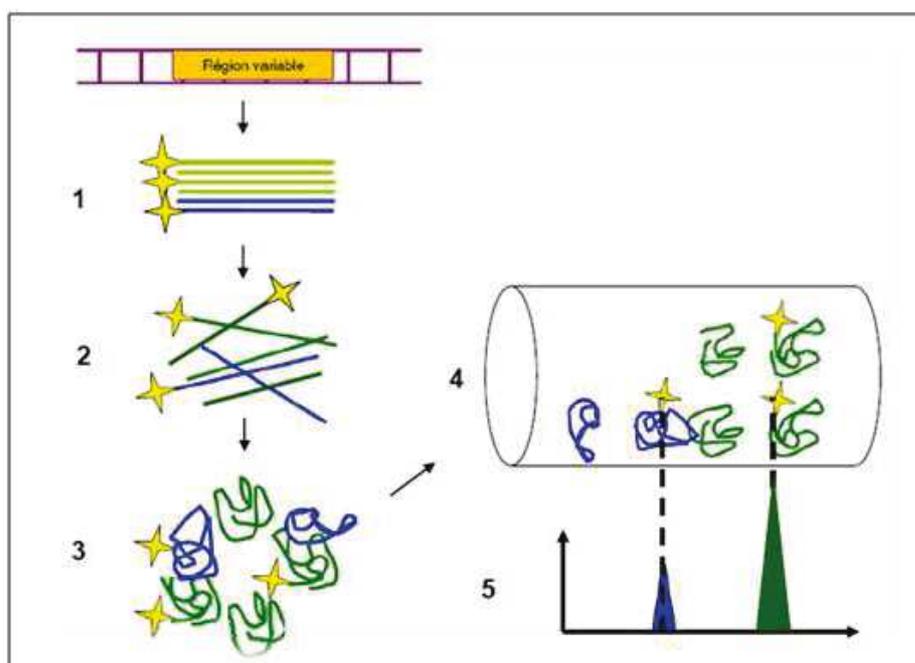


Figure 34 : La CE-SSCP (*Capillary electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism*)

La région variable V3 de l'ARNr 16S est amplifiée par des amorces dont l'une est marquée par un fluorochrome 6FAM (1). Suite à un choc thermique, les monobrans d'ADN adoptent une conformation tridimensionnelle spécifique à la séquence en nucléotides (2 et 3). Les amplicons fluorescents migrent à travers un gel au cours d'une électrophorèse capillaire (4). Ainsi la migration différentielle des monobrans se fait selon leur conformation 3D. L'information est acquise sous forme d'un chromatogramme chaque pic représente la fluorescence émise par chaque ribotype (5).

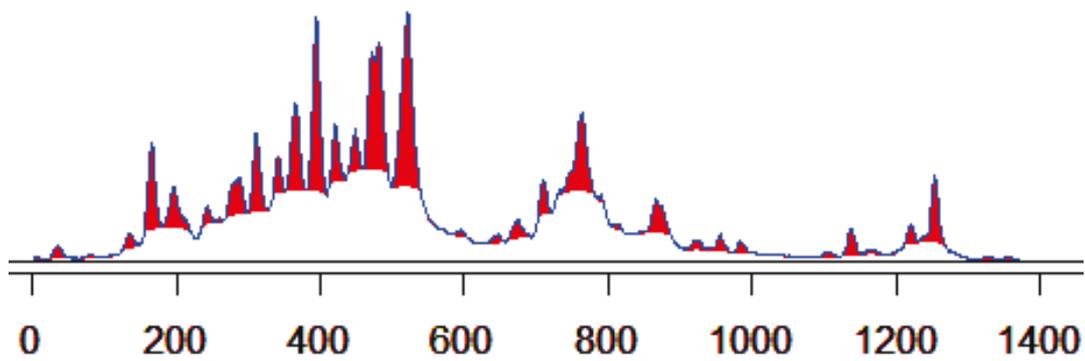


Figure 35 : Exemple d'une analyse d'un profil CE-SSCP d'après (Michelland , 2009)

Le traitement des spectres CE-SSCP est réalisé sur le logiciel R (<http://www.r-project.org/>) à l'aide du package StatFingerprints

L'amplitude des pics est représentée en fonction du nombre de scans (nombre d'acquisition de la fluorescence au cours du temps par un séquenceur. Les monobrin d'ADN ayant migrés le plus vite produisent le pic le plus proche de zéro. Les pics (en rouge sur la Figure 35) représentent les différentes communautés bactériennes. Ils sont utilisés pour le calcul de **l'indice de diversité de Simpson*** (aire en rouge). L'aire sous la base des pics est due aux co-migrations de monobrin d'ADN dans l'échantillon. Ces pics représentent des espèces minoritaires. Le calcul de cette aire permet d'estimer **la richesse** (nombre de pics) en espèces minoritaires (aire blanche) et leur abondance relative (evenness).

*: Simpson: $-\log \sum ai$ ou ai correspond à l'aire sous le pic détecté par CE-SSCP

Manuscript Number:

Title: PROBIOTIC EFFECTS AND ANTIOXIDANT CAPACITIES OF FORMULA DERIVED AGES IN COLON OF IUGR JUVENILE PIGS

Article Type: Original Research/ Original Contribution

Keywords: AGEs, Programming, Microbiota, Colon, IUGR, Formula, redox balance

Corresponding Author: Prof. Latifa Abdennebi-Najar,

Corresponding Author's Institution: Institut Polytechnique LaSalle Beauvais

First Author: Latifa Abdennebi-Najar

Order of Authors: Latifa Abdennebi-Najar; Ghada Elmhiri; Samir Dou; Dounia Hamoudi; Stéphane Firmin; Julie Reygner; Thibaut Larcher; Narges Bahi-Jaber

Abstract: Objective: the present study was conducted to evaluate the impact of the consumption of high AGE formula on changes in the microbiota and the redox balance, during the development, in the colons of juvenile IUGR pigs.

Methods: over a 3 week fifteen day old piglets received period two different heated treated formulas. A high heated temperature formula (HHF, n=8) and a low heated temperature formula (LHF, n=8). After weaning, animals were fed, ad libitum, a solid diet until PND54. The diversity and composition of the major microbiota were analyzed by SSCP and qPCR at PND36 and PND54. Protein oxidation levels, Glutathione peroxidase (GPX) activity, catalase (CAT), manganese dependent superoxide dismutase (Mn SOD), NFkB and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression were measured in colon at juvenile stage (PND54).

Results: HHF resulted in a significant decrease in bacterial diversity in the colon at PND36. We found an increase in the total count of bifidobacteria, lactobacillus, bacteroidetes and enterobacteria, without major changes in total microbiota, following qPCR, suggesting qualitative changes in the bacterial population of the HHF group. The imbalance of microbiota observed at PND36 was significantly modified at PND54, when animals received a solid diet. Colon GPX activity ($p < 0.05$), gene expression of CAT and iNOS were significantly ($p < 0.05$) upregulated in the HHF group. No differences in the total protein oxidation and carbonyl score were found in the HHF group. Colon redox enzymes gene expression and pro-inflammatory factor NFkB negatively correlated ($p < 0.05$) with the bacterial population, suggesting the involvement of certain phyla in controlling the redox balance of the IUGR piglets, fed on the high AGE formula.

Conclusion: during development, consuming a high load AGE formula was associated with a major modification in the diversity and composition of the microbiota. The onset of an IUGR adaptive oxidant defense mechanism was found to counteract the oxidative stress induced by the presence of AGEs in formula.

1 **PROBIOTIC EFFECTS AND ANTIOXIDANT CAPACITIES OF FORMULA**
2 **DERIVED AGES IN COLON OF IUGR JUVENILE PIGS**

3 Ghada ELMHIRI¹, Samir DOU¹, Dounia HAMOUDI¹, Stéphane FIRMIN¹, Julie
4 REYGNIER^{1,2}, Thibaut LARCHER³, Narges BAHJ-JABER¹ and Latifa ABDENNEBI-
5 NAJAR*¹

6 ¹ UP-EGEAL 2012.10.101 Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, 19 Rue Pierre Waguet,
7 Beauvais Cedex, France. ² Laboratoire Périnatalité et Risques Toxiques (PERITOX), UMR-
8 I01 INERIS, UFR de Médecine UPJV, Amiens France ³ INRA, UMR 703 APEX, Ecole
9 Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique (Oniris),
10 Nantes, France.

11
12 **Address correspondance to:** Professor Latifa ABDENNEBI-NAJAR, UP-EGEAL
13 2012.10.101, Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, 19 Rue Pierre Waguet,
14 Beauvais, France.

15 E-mail : latifa.najar@lasalle-beauvais.fr

16 Tél. : + 33 (0)3 44 06 25 42

17 Fax : + 33 (0)3 44 06 25 26

18 **Abbreviations:** AGEs-advanced glycation end products; CML- Nε carboxymethyllysine,
19 IUGR- intrauterine growth retardation; IF-infant formula.

20 **Key Words:** AGEs, Microbiota, Colon, IUGR, Infant Formula, programming, redox
21 **balance**

1 **ABSTRACT**

2 **Objective:** the present study was conducted to evaluate the impact of the consumption of high
3 AGE formula on changes in the microbiota and the redox balance, during the development, in
4 the colons of juvenile IUGR pigs.

5 **Methods:** over a 3 week fifteen day old piglets received period two different heated treated
6 formulas. A high heated temperature formula (HHF, n=8) and a low heated temperature
7 formula (LHF, n=8) . After weaning, animals were fed, *ad libitum*, a solid diet until PND54.
8 The diversity and composition of the major microbiota were analyzed by SSCP and qPCR at
9 PND36 and PND54. Protein oxidation levels, Glutathione peroxidase (GPX) activity, catalase
10 (CAT), manganese dependent superoxide dismutase (Mn SOD), NFkB and inducible nitric
11 oxide synthase (iNOS) gene expression were measured in colon at juvenile stage (PND54).

12 **Results:** HHF resulted in a significant decrease in bacterial diversity in the colon at PND36.
13 We found an increase in the total count of Bifidobacteria, lactobacillus, bacteroidetes and
14 Enterobacteria, without major changes in total microbiota, following qPCR, suggesting
15 qualitative changes in the bacterial population of the HHF group. The imbalance of
16 microbiota observed at PND36 was significantly modified at PND54, when animals received
17 a solid diet. Colon GPX activity ($p<0.05$), gene expression of CAT and iNOS were
18 significantly ($p<0.05$) upregulated in the HHF group. No differences in the total protein
19 oxidation and carbonyl score were found in the HHF group. Colon redox enzymes gene
20 expression and pro-inflammatory factor NFkB negatively correlated ($p<0.05$) with the
21 bacterial population, suggesting the involvement of certain phyla in controlling the redox
22 balance of the IUGR piglets, fed on the high AGE formula.

23 **Conclusion:** during development, consuming a high load AGE formula was associated with a
24 major modification in the diversity and composition of the microbiota. The onset of an IUGR

1 adaptive oxidant defense mechanism was found to counteract the oxidative stress induced by
2 the presence of AGEs in formula.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1 INTRODUCTION

2 Intrauterine growth restriction (IUGR), defined as the weight below the 10th percentile
3 for gestational age [1] affects ~5% of human neonates and is considered a major health
4 problem worldwide [2]. IUGR neonates are not only at increased risk of early growth
5 retardation and death, during infancy and childhood [3], but also have impaired long-term
6 health. IUGR infants are also born with modified bacterial colonization [4] and are also a
7 known to have a higher predisposition to digestive disorders [5]. Consequently, it is important
8 to stimulate the growth and development of IUGR by optimizing their diets to ensure healthy
9 growth and reduce their susceptibility to diseases during adulthood.

10 Although breastfeeding is universally recommended as beneficial to the health [6],
11 infant formula remains the major source of nutrition for those born with IUGR. Infant
12 formulas are very sensitive to the Maillard reaction due to their high content of reducing
13 sugars and lysine-rich proteins [7]. A complex mix of molecules with different molecular
14 weights, ranging from Amadori products to melanoidins [7], is generated after heat treatment
15 of formula foods. The most dominant reaction products include lactosyllysine, [8], N ϵ -
16 carboxymethyllysine (CML), a major marker of AGEs [9, 10] and hydroxymethylfurfural [7].
17 Noticeably, the level of CML in formula [10] exceeds that of human breast-milk, reaching up
18 to 670-fold [11]. Several studies in rodents and adult humans suggest that an excessive intake
19 of high temperature processed foods, rich in AGEs, may affect circulating AGE levels and
20 may play a role in a wide range of harmful health effects including diabetes, pro-
21 inflammatory processes and oxidative stress [12]. Interaction of AGEs with their specific cell
22 surface receptor, RAGE, may result, among others, in the production of reactive oxygen
23 species, induction of inflammation and a range of other effects [13, 14].

1 In infant, AGE-rich formulas were implicated as possible causes for insulin resistance
2 and diabetes, by inducing the inflammation and oxidative stress pathways [15]. However,
3 other studies invalidated these results, since they did not find any evidence for infant formula-
4 associated induction of insulin resistance due to the presence of AGEs [16]. Given that dietary
5 AGEs also appear to have some beneficial effects [17-19], further trials must be undertaken to
6 determine whether a high load of AGEs in formula food, in early childhood, affects infant
7 health and is involved in postnatal programming.

8 The composition of gut microbiota undoubtedly plays an important role in the health
9 of infants and may have additional health benefits in later life [20]. The establishment of
10 infant intestinal microbiota is influenced by many factors [21]; the feeding mode does have an
11 important impact [22, 23]. Introduction of formula, even for a short period of time, disturbs
12 the microbiota [24] particularly in cases of IUGR [4]. Higher protein content [25], lower
13 concentrations of prebiotics, and numerous other biologically active substances in infant
14 formulas, in comparison with breastmilk, are thought to influence the microbiota [26] . Since
15 formulas are highly rich in pro-oxidant dietary AGEs, involved in the programming of
16 oxidative state and inflammatory response in target cells of IUGR individuals [27], we
17 expected that they may modify intestinal microbiota and the redox status of such individuals.

18 Thus, our aim was to investigate the effects of formula food, differing in the load of
19 AGEs, on colon ecology, composition, morphology and redox balance in IUGR piglets at
20 juvenile stage. This study is among the first to investigate how industrial processing of
21 formula food can potentially influences microbiota and redox status in IUGR piglets.

22

23

24

1. MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was designed in compliance with recommendations of French (Decret: 2001-464 29/05/01) and EEC (86/609/CEE) laws. Sixteen natural occurring IUGR piglets, generated according to our previous studies [28-30] were randomly divided into two experimental groups and were fed from day 15 (PND15) until day 36 (PND36) with either High temperature Heated Formula (HHF: 120 °C for 20 min, HHF) or Low temperature Heated Formula (LHF: 37 °C for 5mn, Control) [27]. All animals received an *ad libitum* solid diet until euthanasia on day 54. Animals were scarified by intraperitoneal injection of 90 mg/kg sodium thiopental (Nesdonal, Rhône-Mérieux, France). Feces were collect at PND36 and PND54.

1.1 Protein extraction from colon

Proteins were extracted from 20 mg of colon according to our previous studies [27]. Briefly, tissues were taken in a lysis Ripa Buffer 1X containing a cocktail of protease inhibitor (Thermo Scientific, France). Lysis was performed using a Tissue lyser device (Qiagen, France). Samples were incubated during 15-20 min at 4°C and centrifuged (14000g; 15 min; 4°C). The supernatant was removed and stored at -80°C. Proteins were measured using a Pierce BCA Protein Assay kit according to the manufacturer's instruction. Proteins were suspended and heated 5 min at 95°C and electrophoresis was run on a 4-12% SDS-PAGE (Criterion XT Bis-Tris Gel, Biorad, France).

1.2 Western Blot analysis

Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Biorad, France), after electrophoresis. Membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody

1 (monoclonal anti-RAGE, RD9C 2, Santa Cruz, CA, USA), after being blocked by TBS-T/5%
2 milk, followed by incubation with peroxidase conjugated secondary antibody (goat anti-
3 mouse IgG-HRP, sc-2005). The signal was detected using the ECL kit (Amersham
4 Biosciences) and was quantified by scanning densitometry using ImagQuant 350 (GE
5 Healthcare, France).

6

7 **1.3 RT-PCR**

8 Total RNA was extracted from 20 mg of colon using RNeasy PLUS mini kit Cat.74134
9 (Qiagen, France). The cDNA produced by QuantiTect Rev Transcription Kit (Cat. 205311,
10 Qiagen, France) and the relative expression of studied genes was determined by RT-PCR
11 (Rotor-Gene Q – Cycler, Qiagen, France). Gene-specific primers sequences pairs were given
12 in table 1. PCR conditions were 10 min at 95°C for enzyme activation, followed by 40 two-
13 step cycles (15 sec at 95°C; 1 min at 60°C). The levels of β actin expression were measured in
14 all samples to normalize gene. Each sample was analyzed in triplicate, and the expression was
15 calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

16

17 **1.4 Microbiological analysis**

18 *CE-SSCP profile processing*

19 Twenty five μ L volume PCR reactions were performed with high fidelity AmpliTaq Gold 360
20 (Life technologies ©, 60 ng DNA and 300 nM universal primers (Table 1) for the target
21 region V3 of 16S rDNA of bacteria). The PCR products were diluted 10X in high grade
22 formamide (Life Technologies ©) and heated for 10 min at 95°C. The denatured amplicons
23 were immediately placed on ice for 10 min. Then, 1 μ L was mixed with 0.15 μ L internal lane
24 size standard (Life Technologies ©) and 10 μ L formamide. Capillary electrophoresis was
25 performed on an ABI prism sequencer 3130 with 6% CAP polymer (Life Technologies ©),

1 10% glycerol (Sigma Aldrich ©), 10% Tris-Borate-EDTA (Sigma Aldrich ©) and high grade
2 molecular biology water. The running voltage was 15 KV at 25°C. The electrophoresis
3 provided a fingerprint pattern for each animal that was a snap-shot of the fecal bacterial
4 ecosystem. Within the fingerprint pattern, dominant, subdominant, and very small peaks were
5 associated with the numerical dominant, subdominant, and rare phylotypes (Sequences or
6 Operational Taxonomic Units), respectively [31, 32]. The structure of fecal bacterial
7 community fingerprints provided by CE-SSCP was analyzed with Statfingprints according
8 to previous studies. The Simpson and Shannon indexes were calculated according to [33].
9 These indexes represent the fecal bacterial community assemblage in terms of number of
10 phylotypes (richness) and their relative abundances (evenness).

11

12 *Bacterial DNA Extraction and qPCR analysis on 16s RNA genes*

13 Total bacterial count and specific profile were evaluated by quantitative PCR analyses
14 targeting bacterial group-specific 16S rRNA genes using the Rotor-Gene system (Qiagen,
15 France). Total DNA was extracted from 20 to 25 mg of feces using the Qiagen QIAamp. Fast
16 DNA stool kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen, France). DNA from each
17 sample was amplified using selected primers and probe sets as detailed in Table 1 [34, 35].
18 Briefly, each reaction tube contained 3 µL DNA, 4 µL Evagreen Super Mix (SolyBiodyn ©),
19 and 250 nM primers , and reaction mix was brought up to 20 µL with high grade molecular
20 biology water. The reaction tubes were placed in a thermocycler, and the polymerase was
21 activated for 12 min at 95°C. The PCR cycles were as follows: 30 s for denaturation at 95°C,
22 30 s for annealing at 60°C and 30 s for elongation at 72°C. Standard quantitation curves of
23 primers for all bacteria and Enterobacteria were obtained from pure culture of Escherichia
24 coli. Standard quantitation curves of primers for Bifidobacteria, Lactobacillus, Firmicutes,
25 and Bacteroidetes were assessed with primers indicated in table 1. The Cq value of each

1 sample was compared to the linear standard curve and plotted as Cq vs. gene log copies
2 number [36]. Results are expressed as the number of targeted copies per 100 µg of DNA.

3

4 **1.5 Measurement of oxidized proteins in the colon**

5 Colon samples were submitted to protein carbonylation analysis with Oxiproteomic SAS.
6 Total proteins were quantified by Bradford method and separated on SDS-PAGE
7 electrophoresis. Proteins were labelled with a fluorescent reagent SyproRuby™ (Life
8 Technologies, USA) and detected at a specific wavelength of $\lambda_{ex}390/\lambda_{em}595$ for total
9 proteins and $\lambda_{ex}480/\lambda_{em}530$ for carbonylated proteins. Bands were visualized by Ettan DIGE
10 image (GE Healthcare) and image analysis was performed using “Image J” software (NIH,
11 USA).

12

13 **1.6 GPX activity in the colon**

14 After homogenization of colon tissues in a buffer solution and centrifugation at 4000g for 20
15 min, the supernatants were diluted to the optimal content for detecting GPX activity. Changes
16 in absorbance was detected at a specific wavelength $\lambda=530$. All absorbance levels were
17 measured using an UV-light spectrophotometer according to manufacture recommendations
18 (Cayman Chemical Company). GPX activity values were normalized to proteins
19 concentration (BCA protein assay kit, Sigma Aldrich).

20 **1.7 Histological analysis**

21 Morphometric analysis of colon tissues was established according to our previous studies
22 [29]. After paraffin embedding, colon were sectioned (8 µm thick) and histological sections
23 were stained using the protocol describes previously [37]. Histological measurements were
24 made using image analysis software (Nikon Imaging Software).

1 **1.8 Statistical analysis**

2 All results were subjected to non-parametric Kruskal Wallis and *t-test* test using the GraphPad
3 Software prism (version 5.02). For all analyses, the level of significance was set at $P<0.05$.
4 All values are expressed as means \pm SEM.

6 **2. RESULTS**

7 **2.1. HHF formula modified early microbiota diversity at PND36 and PND54**

8 Evolution of the microbial diversity was evaluated at PND36 and PND54, respectively
9 (Figure 1 A-D). A lower value of the Simpson index was observed at PND36, but not at
10 PND54 in HHF compared to LHF pigs (Figure 1 A, B). The Shannon index, however, was
11 significantly ($p<0.05$) higher at both PND36 and PND 54 in HHF group compared to LHF
12 (Figure 1C, 1D). No variation in the richness index was observed between treatments.

13 **2.2.HHF modified the bacterial composition at PND36 and PND54**

14 HHF Formula induced major changes in bacterial profile (Figure 2A-J). Although we did
15 not observe any significant differences in the total count of all bacterial populations
16 between the two groups (Figure 2A, B), HHF induced a shift in the relative abundance of
17 bacteria specific phyla in the microbiota. We found 2- and 3- fold increases in the relative
18 abundance of Bacteroides at PND36 and PND54 (Figure 2E, F). Lactobacillus (Figure 2 C)
19 and Enterobacteria (Figure 2 G) increased only at PND36, but not at PND54 in HHF group
20 compared to the LHF group (2 fold and 3 fold respectively), while Bacteroidetes increased
21 at both PND36 and PND54 in the HHF group compared to the LHF group. Bifidobacteria
22 increased significantly ($p<0.05$) only at PND36 in HHF compared to LHF fed animals

1 (Figure 2 I). The total count of Firmicutes at PND54 was also significantly ($p<0.05$) higher
2 in the HHF group as compared to the LHF group (Figure 2K).

3 4 **2.3.HHF formula modified the redox status in the colon**

5
6 Although we observed a major decrease in the mean level of protein oxidation in the colons of
7 HHF animals, this decrease was not statistically significant between the two groups. This is
8 mainly due to the low number of samples analyzed in each group ($n=5$), and the high standard
9 deviation between animals (in HHF, there is one sample with a high value of carbonyl score
10 as compared to the mean value of the group). iNOS expression significantly ($p<0.05$)
11 increased in the HHF group (Figure 4 A) compared to LHF one, but no difference was seen
12 in NFkB gene expression between the two groups (Figure 4 B). CAT gene expression was
13 upregulated in HHF-fed animals (Figure 4 C), while no difference in MnSOD was observed
14 (Figure 4D). GPX activity, however, increased ($p<0.05$) in the HHF group compared to LHF
15 group (Figure 4, E).

16 17 **2.4. HHF formula induced modified RAGE expression in the colon**

18 The presence of RAGE was confirmed by Western blot (Figure. 5A). Results showed a
19 significant increase of RAGE in HHF fed animals compared to LHF-fed animals ($p< 0.05$;
20 HHF, $n=8$ vs LHF, $n=8$), (Figure 5B).

21 **2.5. HHF did not modify the histological structure of the colon**

22 We did not observe any alteration in colon structure. No increase in the mononuclear cell
23 population normally present in the colon mucosa was detected in both LHF and HHF groups
24 (Figure 6).

2.6. Diversity and microbiota composition is linked to inflammation and oxidant status

The different correlations between microbiota composition and diversity with antioxidant enzymes are represented in table 3. Firmicutes negatively correlated with CAT expression ($r = -0.72$; $p < 0.01$) but positively correlate with GPX expression ($r = 0.68$, $P < 0.01$). Lactobacillus negatively correlated with NFkB ($r = -0.75$, $P < 0.01$) and positively correlated with PE-SOD ($r = 0.69$, $P < 0.05$). iNOS negatively correlated with the richness index ($r = -0.60$, $P < 0.05$). GPX positively correlated with Firmicutes ($r = 0.68$, $P < 0.01$).

3. DISCUSSION

Infant formula fed babies are exposed to high levels of AGEs generated during the heat treatment process of formula manufacturing [7]. The use of HHF formula has been found to alter the faecal bacterial community of IUGR piglets and modify its composition. Specifically, fingerprint molecular studies showed that the Simpson diversity index of the faecal bacterial community was lower while the Shannon index was higher in the HHF formula group compared to the LHF one. As no difference in the richness index occurred at that stage, the lower Simpson diversity index and the higher Shannon index were explained by less proportion of dominant species and more abundant minorities species in HHF fed piglets. By qPCR studies we have shown that HHF fed animals presented a significant increase of the number of Bifidobacteria, Lactobacilli and Enterobacteria without any significant changes in the quantity of total bacteria. These results denote qualitative changes in the bacterial population in the colon of animals fed a high load AGEs derived formula. This fact has already been described in other studies with additives [38, 39]. The benefits of increased Lactobacilli and Bifidobacteria counts at PND36, in piglets fed with the HHF, were temporary as no differences in the total counts of Lactobacilli were observed between the two

1 groups at PND54. However, it's important to mention that after weaning, the Shannon
2 diversity and the evenness index were higher in the HHF groups indicating that the fecal
3 bacterial community of HHF and LHF animals differed at PND54. This could be linked to
4 higher bacterial numbers in the major phyla i.e. Bacteroidetes and Firmicutes in the HHF
5 group compared to the LHF. Concern has been raised regarding the possible link between
6 bacterial diversity and evenness of ecosystems and their ability to respond to gastrointestinal
7 perturbations [40]. A higher gut bacterial diversity index was reported with prebiotics in
8 weaned pigs [41] denoting a possible pre or probiotic AGEs like effects by the given formula.
9 The total counts of Lactobacilli and Bifidobacteria at PND36 is positively correlated with the
10 microbiota profile at PND54, suggesting that the early shift of microbiota in HHF-fed animals
11 may affect the adult intestinal microbiota [20]. Lactobacilli and bifidobacteria are among the most
12 widely known probiotics that are able to prevent pathogens from proliferating in the intestinal
13 tract and stimulating the immune system of the host [42-44]. Noticeably, the long term
14 modification of colon microbiota in HHF animals did not induce any changes to the structure
15 nor the integrity of colon mucosa, as seen in histological studies. No signs of diarrhea were
16 observed during the experiment arguing that the consumption of the HHF regimen did not
17 induce any side effects in the IUGR intestinal tract. However, whether these modifications
18 have an impact on other immunological or physiological processes remains to be determined,
19 as they were not in the scope of this study.

20 It is known that formulas sterilization causes severe alteration in proteins, and induces
21 nutritional loss due to the large extent of lysine blockage. High temperature treatment of the
22 HHF induces an increase in the amount of AGEs, including CML [27], and probably the loss
23 of the bioavailability of some amino acids, such as lysine. These protein modifications may
24 induce some fermentation processes and enhance of specific phyla, as shown previously. In
25 the studies of weaned piglets, the fermentation of high amounts of protein often coincided

1 with the growth of potential pathogens, thereby increasing the risk for infectious diseases. In
2 addition, fermentation of dietary proteins produces detrimental substances, including
3 ammonia, phenol and amines which can modulate the host health [45]. Some studies with
4 infant formula, supplemented with low proteins and high carbohydrates, showed an important
5 change in the developmental profile of microbiota [25]. Low protein formula was indeed
6 more bifidogenic than the commercial formula, and led to a microbiota profile similar to that
7 of human breast milk-fed neonates. In our study, the HHF diet was much more lactogenic and
8 bifidogenic than LHF one, suggesting beneficial effects of heat treatment on pig microbiota.
9 Among the AGEs present in formula, melanoidins are known to play the role of prebiotics.
10 Several *in vitro* and *in vivo* studies were showed that these compounds promote the increase
11 of Bifidobacteria and lactobacilli. However, the benefits of the increase of such phyla in our
12 experiments were not clear in this short-term study. It is important to highlight that the
13 correlation between some antioxidant enzymes with the total counts of bacteria strongly
14 support that the modification of bacterial composition might be a major contributor to the
15 promotion of antioxidant defense. Thus, we propose that the consumption of a high load AGE
16 formula by IUGR might trigger the “programming” of anti-oxidant mechanism “ to counteract
17 the worsening state of the oxidative stress induced by the accumulation of some harmful
18 AGEs in the colon. We previously demonstrated that IUGR fed on a high load AGE formula
19 translocate RAGE to the nuclei of kidney cells to get rid of the excess of AGEs in the kidney
20 [27]. Hence, in this study, we suggest that the colon redox rebalance initiated in IUGR
21 animals to defend against AGE-linked oxidative stress might be linked to the presence of
22 beneficial bacteria. Consequently, the development of early adaptive microbiota equilibrium
23 during suckling with the HHF formula may induce long term modification of adult
24 microbiota. An increase in the total count of Bacteroidetes and a decrease in Enterobacteria in
25 the HHF group were observed at PND54. Although the study did not directly assess the effect

1 of Lactobacillus and Bifidobacteria, the fact that a negative correlation between Lactobacillus
2 and CAT expression was seen suggest that Lactobacilli are very sensitive to oxidative stress
3 [46]. Likewise, some studies have found that Lactobacilli possess excellent antioxidant
4 capacity by scavenging free radicals [47, 48], and have an anti-microbial effect by inhibiting
5 the development of pathogenic bacteria as found in vivo in axenic and conventional mice
6 infected salmonellas or *E coli* [49-51]. It has also been shown that Lactobacillus and
7 Bifidobacteria induce a decrease of both intraluminal pH and an increase in Short Chain Fatty
8 Acids (SCFA), which are beneficial to the decrease of pathogen bacteria by probiotics [52]. In
9 addition, the strong negative correlation between the expression of iNOS, and microbiota
10 diversity from one part, and iNOS and the total count of Firmicutes, from the other part,
11 reinforce the fact that some bacterial phyla are strongly associated to the redox status in the
12 colon of IUGR animals. Moreover, the negative correlation between Lactobacillus and the
13 expression of NFkB and iNOS confirms that the decrease of beneficial bacteria in the colon
14 is associated to the activation of a pro-inflammatory state and induce nitrite oxide synthase
15 expression in the presence of AGEs [27]. Other studies have reported the association between
16 an anti-oxidant state and the composition of microbiota [53], and revealed that the host
17 initiates mechanisms to permit the adaptation of bacteria to oxidative stress. For example,
18 OxyR-dependent proteins such as AhpF, Dps, and Fur, play a major role in the adaptation of
19 *E. coli* to oxidative stress [54].

20 Therefore, owing to enhancement of potential beneficial bacteria in the HHF-fed animals,
21 formula fermented AGEs and/or melanoidins may be the origin of the anti-oxidant state
22 against AGEs oxidative stress, as reported by previous studies [17, 55]. However, the
23 mechanism that highly fermented Maillard reaction products or melanoidines use to increase
24 fecal probiotic numbers still needs to be established [56]. One possibility is that fermented
25 MRPs or melanoidins may protect bacteria against bile acid, free fatty acid, and partial

1 digestion products that have bactericidal action [57]. This mechanism may be RAGE
2 dependant as we observed an increase in RAGE expression in the colon of HHF-fed animals.
3 In summary, we show a close association between low bacterial diversity, at PND36, with an
4 increase in specific probiotic phyla. Furthermore, at PND54 we find an increase in bacterial
5 diversity with a modification of bacterial composition and some markers of redox status in
6 IUGR animals fed on an HHF diet. Thus, in the context of this study, the high level of AGEs
7 in formula feeding did not have any side effects on the colon structure of IUGR piglets, but
8 might be suitable for the development of a more diverse microbiota population at the juvenile
9 stage and a decrease in oxidative stress. Further studies are needed to determine whether the
10 observed effects of the high load of AGEs in formula are linked to the pathophysiology of the
11 IUGR and/ or to the effects of AGEs per. The exact molecules and mechanisms underlying
12 such interesting effects of AGE components in formula remain to be determined.

13

14 **Author contributions**

15 Ghada Elmhiri and Latifa Abdennebi-Najar conceptualized and designed the study, drafted
16 the initial manuscript.

17 Latifa ADENNEBI-NAJAR, Ghada ELMHIRI, Samir DOU, Dounia HAMOUDI, and
18 Thibaut LARCHER designed the data collection instruments.

19 Ghada ELMHIRI, Samir DOU, Julie REYGNIER, Dounia HAMMOUDI, Stéphane FIRMIN,
20 Thibaut LARCHER and Narges BAHJ-JABBER, carried out the initial analyses and analysed
21 the results.

22 Ghada ELMHIRI, Samir DOU, Stephan FIRMIN, Narges BAHJ-JABBER , Thibaut
23 LARCHER and Latifa ABDENNEBI-NAJAR reviewed and revised the manuscript, and
24 approved the final manuscript as submitted.

1 Latifa ABDENNEBI-NAJAR coordinated and supervised data collection critically approved
2 the final manuscript as submitted

3 **Acknowledgments**

4 Authors thank Camille Mayeur from INRA (MICALIS, Jouy en Josas) and Dr Martin
5 Baraibar (UPMC, Paris VI) for assistance.

6 **Conflict of Interest statement:** The authors have no conflicts of interest relevant to this
7 article to disclose.

8 **Financial Disclosure:** The authors have no financial relationships relevant to this article to
9 disclose.

10 **Funding:** Institut Polytechnique LaSalle Beauvais

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

1 FIGURES LEGENDS

2 **Figure 1: Dynamics of bacterial diversity in HHF- and LHF- IUGR fed piglets**

3 Simpson index in HHF and LHF IUGR fed piglets at PND36 (Figure 1A) and PND54 (Figure
4 1 B). Shannon index in HHF and LHF IUGR fed piglets at PND36 (Figure 1C) and PND54
5 (Figure 1D). Evenness in HHF and LHF IUGR fed piglets at PND36 (1E) and PND54
6 (F).Data are expressed as Mean \pm SEM (*t-test*). Significant difference between HHF (n=8)
7 and LHF (n=8) groups *: $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, ns= not significant.

8 **Figure 2: Non-cultivation based quantitation (qPCR) of colon microbiota in HHF- and** 9 **LHF-fed animals at PND36 and PND54**

10 Quantification of total bacteria at PND36 and PND54 (A and B, respectively); Lactobacillus
11 at PND36 and PND54 (C and D, respectively); Bacteroidetes at PND36 and PND54 (E and F,
12 respectively); Enterobacteria at PND36 and PND54 (G and H, respectively); Bifidobacteria at
13 PND36 and PND54 (I and J, respectively,) and Firmicutes at PND36 and PND54 (K and L,
14 respectively).

15 **Figure 3: Proteins carbonylation in HHF- and LHF-fed IUGR piglets at PND54**

16 Intensity of carbonylated proteins (A) and measured carbonylated score (B). Values are
17 expressed as Mean \pm SEM (*t-test*). ns: non-significant difference between LHF (n=5) and
18 HHF (n=5) groups.

19 **Figure 4: Redox status in LHF- and HHF-fed IUGR piglets at PND54**

20 Quantification of iNOS (A), NFkB (B), Catalase (C) and MnSOD (D) gene expression by
21 qPCR . Data are expressed as arbitrary units relative to β actin. Mean \pm SEM (*t-test*). E: GPX
22 activity (values were normalized to protein concentration).

1 Significant difference between HHF (n=8) and LHF (n=8) groups *: $P < 0.05$; ns: non-
2 significant difference between LHF (n=5) and HHF (n=5) groups.

3

4 **Figure 5: Determination of RAGE in colon by Western blot in HHF- and LHF-fed**
5 **IUGR piglets at PND54**

6 Quantification of cytoplasmic RAGE, by Western Blot . Data are expressed as Mean \pm SEM
7 (*t-test*). Significant difference between HHF (n=8) and LHF (n=8) groups *: $P < 0.05$

8 **Figure 6: Histological analysis of colon in LHF- and HHF-fed IUGR piglets at PND54**

9 **TABLE LEGENDS**

10 **Table 1:** sequence of bacterial primers set for microbiota studies in colons

11 **Table 2:** sequence of primers set for gene expression studies in colons

12 **Table 3:** Spearman correlation coefficient between antioxidant enzymes and microbiota
13 population and diversity in colons of IUGR piglets at PND54

14 a: Significant correlation analyzed at $P < 0.05$.

15 b: Significant correlation analyzed at $P < 0.01$.

16

17

18

19

20

21

22

1 REFERENCES

- 2 [1] Mandruzzato, G.; Antsaklis, A.; Botet, F.; Chervenak, F. A.; Figueras, F.; Grunebaum, A.;
3 Puerto, B.; Skupski, D.; Stanojevic, M. Intrauterine restriction (IUGR). *J Perinat Med* **36**:277-281;
4 2008.
- 5 [2] WHO. Low birth weight: a tabulation of available information. *Geneva: WHO/MCH/92.2.;*
6 *1992.* ; 1992.
- 7 [3] Gilbert, W. M.; Danielsen, B. Pregnancy outcomes associated with intrauterine growth
8 restriction. *Am J Obstet Gynecol* **188**:1596-1599; discussion 1599-1601; 2003.
- 9 [4] D'Inca, R.; Kloareg, M.; Gras-Le Guen, C.; Le Huerou-Luron, I. Intrauterine growth restriction
10 modifies the developmental pattern of intestinal structure, transcriptomic profile, and bacterial
11 colonization in neonatal pigs. *J Nutr* **140**:925-931; 2010.
- 12 [5] Garite, T. J.; Clark, R.; Thorp, J. A. Intrauterine growth restriction increases morbidity and
13 mortality among premature neonates. *Am J Obstet Gynecol* **191**:481-487; 2004.
- 14 [6] Nutrition., E. C. o. Enteral nutrient supply for preterm infants.; 2009.
- 15 [7] Pischetsrieder, M.; Henle, T. Glycation products in infant formulas: chemical, analytical and
16 physiological aspects. *Amino Acids* **42**:1111-1118; 2012.
- 17 [8] Erbersdobler, H.; Dehn, B.; Nangpal, A.; Reuter, H. Determination of furosine in heated milk
18 as a measure of heat intensity during processing. *J Dairy Res* **54**:147-151; 1987.
- 19 [9] Knecht, K. J.; Dunn, J. A.; McFarland, K. F.; McCance, D. R.; Lyons, T. J.; Thorpe, S. R.; Baynes,
20 J. W. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes* **40**:190-
21 196; 1991.
- 22 [10] Meng, J.; Sakata, N.; Takebayashi, S.; Asano, T.; Futata, T.; Nagai, R.; Ikeda, K.; Horiuchi, S.;
23 Myint, T.; Taniguchi, N. Glycooxidation in aortic collagen from STZ-induced diabetic rats and its
24 relevance to vascular damage. *Atherosclerosis* **136**:355-365; 1998.
- 25 [11] Sebekova, K.; Saavedra, G.; Zumppe, C.; Somoza, V.; Klenovicsova, K.; Birlouez-Aragon, I.
26 Plasma concentration and urinary excretion of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in breast milk- and
27 formula-fed infants. *Ann N Y Acad Sci* **1126**:177-180; 2008.
- 28 [12] Uribarri, J.; Cai, W.; Sandu, O.; Peppia, M.; Goldberg, T.; Vlassara, H. Diet-derived advanced
29 glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in
30 healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci* **1043**:461-466; 2005.
- 31 [13] Bierhaus, A.; Humpert, P. M.; Morcos, M.; Wendt, T.; Chavakis, T.; Arnold, B.; Stern, D. M.;
32 Nawroth, P. P. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med*
33 *(Berl)* **83**:876-886; 2005.
- 34 [14] Haslbeck, K. M.; Schleicher, E.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; Haslbeck, M.; Neundorfer, B.;
35 Heuss, D. The AGE/RAGE/NF-(kappa)B pathway may contribute to the pathogenesis of
36 polyneuropathy in impaired glucose tolerance (IGT). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **113**:288-291; 2005.
- 37 [15] Mericq, V.; Piccardo, C.; Cai, W.; Chen, X.; Zhu, L.; Striker, G. E.; Vlassara, H.; Uribarri, J.
38 Maternally transmitted and food-derived glycotoxins: a factor preconditioning the young to
39 diabetes? *Diabetes Care* **33**:2232-2237; 2010.
- 40 [16] Klenovics, K. S.; Boor, P.; Somoza, V.; Celec, P.; Fogliano, V.; Sebekova, K. Advanced glycation
41 end products in infant formulas do not contribute to insulin resistance associated with their
42 consumption. *PLoS One* **8**:e53056; 2013.
- 43 [17] Oh, N. S.; Park, M. R.; Lee, K. W.; Kim, S. H.; Kim, Y. Dietary Maillard reaction products and
44 their fermented products reduce cardiovascular risk in an animal model. *J Dairy Sci* **98**:5102-5112;
45 2015.
- 46 [18] Chuyen, N. V. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship
47 of food-AGEs and biological-AGEs. *Mol Nutr Food Res* **50**:1140-1149; 2006.
- 48 [19] Pastoriza, S.; Rufian-Henares, J. A. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of
49 the Spanish diet. *Food Chem* **164**:438-445; 2014.

- 1 [20] Morelli, L. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *J*
2 *Nutr* **138**:1791S-1795S; 2008.
- 3 [21] Biasucci, G.; Benenati, B.; Morelli, L.; Bessi, E.; Boehm, G. Cesarean delivery may affect the
4 early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr* **138**:1796S-1800S; 2008.
- 5 [22] Harmsen, H. J.; Wildeboer-Veloo, A. C.; Raangs, G. C.; Wagendorp, A. A.; Klijn, N.; Bindels, J.
6 G.; Welling, G. W. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by
7 using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30**:61-67; 2000.
- 8 [23] Tannock, G. W.; Munro, K.; Harmsen, H. J.; Welling, G. W.; Smart, J.; Gopal, P. K. Analysis of
9 the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus*
10 *rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol* **66**:2578-2588; 2000.
- 11 [24] Palmer, C.; Bik, E. M.; DiGiulio, D. B.; Relman, D. A.; Brown, P. O. Development of the human
12 infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* **5**:e177; 2007.
- 13 [25] Fan, W.; Tang, Y.; Qu, Y.; Cao, F.; Huo, G. Infant formula supplemented with low protein and
14 high carbohydrate alters the intestinal microbiota in neonatal SD rats. *BMC Microbiol* **14**:279; 2014.
- 15 [26] Mueller, N. T.; Bakacs, E.; Combellick, J.; Grigoryan, Z.; Dominguez-Bello, M. G. The infant
16 microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med* **21**:109-117; 2015.
- 17 [27] Elmhiri, G.; Mahmood, D. F.; Niquet-Leridon, C.; Jacolot, P.; Firmin, S.; Guigand, L.; Tessier, F.
18 J.; Larcher, T.; Abdennebi-Najar, L. Formula-derived advanced glycation end products are involved in
19 the development of long-term inflammation and oxidative stress in kidney of IUGR piglets. *Mol Nutr*
20 *Food Res* **59**:939-947; 2015.
- 21 [28] Attig, L.; Djiane, J.; Gertler, A.; Rampin, O.; Larcher, T.; Boukthir, S.; Anton, P. M.; Madec, J. Y.;
22 Gourdou, I.; Abdennebi-Najar, L. Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-
23 weight piglets and effects of leptin supplementation on neonatal growth and development. *Am J*
24 *Physiol Endocrinol Metab* **295**:E1117-1125; 2008.
- 25 [29] Attig, L.; Brisard, D.; Larcher, T.; Mickiewicz, M.; Guilloteau, P.; Boukthir, S.; Niamba, C. N.;
26 Gertler, A.; Djiane, J.; Monniaux, D.; Abdennebi-Najar, L. Postnatal leptin promotes organ maturation
27 and development in IUGR piglets. *PLoS One* **8**:e64616; 2013.
- 28 [30] Blat, S.; Morise, A.; Sauret, A.; Louveau, I.; Mace, K.; Le Huerou-Luron, I.; Seve, B. The protein
29 level of isoenergetic formulae does not modulate postprandial insulin secretion in piglets and has no
30 consequences on later glucose tolerance. *Br J Nutr* **108**:102-112; 2012.
- 31 [31] Sen, B.; Hamelin, J.; Bru-Adan, V.; Godon, J. J.; Chandra, T. S. Structural divergence of
32 bacterial communities from functionally similar laboratory-scale vermicomposts assessed by PCR-CE-
33 SSCP. *J Appl Microbiol* **105**:2123-2132; 2008.
- 34 [32] Loisel, P.; Harmand, J.; Zemb, O.; Latrille, E.; Lobry, C.; Delgenes, J. P.; Godon, J. J. Denaturing
35 gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular
36 fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ*
37 *Microbiol* **8**:720-731; 2006.
- 38 [33] Magurran, A. E. Measuring Biological Diversity. . *John Wiley & Sons*; 2013.
- 39 [34] Mayeur, C.; Gratadoux, J. J.; Bridonneau, C.; Chegdani, F.; Larroque, B.; Kapel, N.; Corcos, O.;
40 Thomas, M.; Joly, F. Faecal D/L lactate ratio is a metabolic signature of microbiota imbalance in
41 patients with short bowel syndrome. *PLoS One* **8**:e54335; 2013.
- 42 [35] Ettoreiki, C.; Gadonna-Widehem, P.; Mangin, I.; Coeffier, M.; Delayre-Orthez, C.; Anton, P. M.
43 Juvenile ferric iron prevents microbiota dysbiosis and colitis in adult rodents. *World J Gastroenterol*
44 **18**:2619-2629; 2012.
- 45 [36] Ryu, H.; Henson, M.; Elk, M.; Toledo-Hernandez, C.; Griffith, J.; Blackwood, D.; Noble, R.;
46 Gourmelon, M.; Glassmeyer, S.; Santo Domingo, J. W. Development of quantitative PCR assays
47 targeting the 16S rRNA genes of *Enterococcus* spp. and their application to the identification of
48 enterococcus species in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **79**:196-204; 2013.
- 49 [37] Attig, L.; Larcher, T.; Gertler, A.; Abdennebi-Najar, L.; Djiane, J. Postnatal leptin is necessary
50 for maturation of numerous organs in newborn rats. *Organogenesis* **7**:88-94; 2011.

- 1 [38] Canibe, N.; Hojberg, O.; Hojsgaard, S.; Jensen, B. B. Feed physical form and formic acid
2 addition to the feed affect the gastrointestinal ecology and growth performance of growing pigs. *J*
3 *Anim Sci* **83**:1287-1302; 2005.
- 4 [39] Hojberg, O.; Canibe, N.; Poulsen, H. D.; Hedemann, M. S.; Jensen, B. B. Influence of dietary
5 zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Appl*
6 *Environ Microbiol* **71**:2267-2277; 2005.
- 7 [40] McCann, K. S. The diversity-stability debate. *Nature* **405**:228-233; 2000.
- 8 [41] Janczyk, P.; Pieper, R.; Smidt, H.; Souffrant, W. B. Effect of alginate and inulin on intestinal
9 microbial ecology of weanling pigs reared under different husbandry conditions. *FEMS Microbiol Ecol*
10 **72**:132-142; 2010.
- 11 [42] Meijerink, M.; van Hemert, S.; Taverne, N.; Wels, M.; de Vos, P.; Bron, P. A.; Savelkoul, H. F.;
12 van Bilsen, J.; Kleerebezem, M.; Wells, J. M. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum*
13 that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PLoS*
14 *One* **5**:e10632; 2010.
- 15 [43] Marzotto, M.; Maffei, C.; Paternoster, T.; Ferrario, R.; Rizzotti, L.; Pellegrino, M.; Dellaglio, F.;
16 Torriani, S. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal
17 microbiota of healthy infants. *Res Microbiol* **157**:857-866; 2006.
- 18 [44] Jan, R. L.; Yeh, K. C.; Hsieh, M. H.; Lin, Y. L.; Kao, H. F.; Li, P. H.; Chang, Y. S.; Wang, J. Y.
19 *Lactobacillus gasseri* suppresses Th17 pro-inflammatory response and attenuates allergen-induced
20 airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Br J Nutr* **108**:130-139; 2012.
- 21 [45] Nyangale, E. P.; Mottram, D. S.; Gibson, G. R. Gut microbial activity, implications for health
22 and disease: the potential role of metabolite analysis. *J Proteome Res* **11**:5573-5585; 2012.
- 23 [46] Roy, D. G.; Klaenhammer, T. R.; Hassan, H. M. Cloning and expression of the manganese
24 superoxide dismutase gene of *Escherichia coli* in *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus gasseri*. *Mol Gen*
25 *Genet* **239**:33-40; 1993.
- 26 [47] Wang, J.; Ji, H. F.; Wang, S. X.; Zhang, D. Y.; Liu, H.; Shan, D. C.; Wang, Y. M. *Lactobacillus*
27 *plantarum* ZLP001: In vitro Assessment of Antioxidant Capacity and Effect on Growth Performance
28 and Antioxidant Status in Weaning Piglets. *Asian-Australas J Anim Sci* **25**:1153-1158; 2012.
- 29 [48] Xiao, M.; Xu, P.; Zhao, J.; Wang, Z.; Zuo, F.; Zhang, J.; Ren, F.; Li, P.; Chen, S.; Ma, H. Oxidative
30 stress-related responses of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68 at the proteomic level
31 after exposure to oxygen. *Microbiology* **157**:1573-1588; 2011.
- 32 [49] Coconnier, M. H.; Lievin, V.; Bernet-Camard, M. F.; Hudault, S.; Servin, A. L. Antibacterial
33 effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother*
34 **41**:1046-1052; 1997.
- 35 [50] Shu, Q.; Gill, H. S. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of
36 *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol* **189**:147-152; 2001.
- 37 [51] Suzuki, T.; Itoh, K.; Kaneko, T.; Suzuki, H. Inhibition of bacterial translocation from the
38 gastrointestinal tract of mice by oral administration of a culture condensate of *Bifidobacterium*
39 *longum*. *J Vet Med Sci* **59**:665-669; 1997.
- 40 [52] Kruis, W.; Schutz, E.; Fric, P.; Fixa, B.; Judmaier, G.; Stolte, M. Double-blind comparison of an
41 oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis.
42 *Aliment Pharmacol Ther* **11**:853-858; 1997.
- 43 [53] Xu, J.; Xu, C.; Chen, X.; Cai, X.; Yang, S.; Sheng, Y.; Wang, T. Regulation of an antioxidant blend
44 on intestinal redox status and major microbiota in early weaned piglets. *Nutrition* **30**:584-589; 2014.
- 45 [54] Rothe, M.; Alpert, C.; Engst, W.; Musiol, S.; Loh, G.; Blaut, M. Impact of nutritional factors on
46 the proteome of intestinal *Escherichia coli*: induction of OxyR-dependent proteins AhpF and Dps by a
47 lactose-rich diet. *Appl Environ Microbiol* **78**:3580-3591; 2012.
- 48 [55] Oh, N. S.; Lee, H. A.; Lee, J. Y.; Joung, J. Y.; Lee, K. B.; Kim, Y.; Lee, K. W.; Kim, S. H. The dual
49 effects of Maillard reaction and enzymatic hydrolysis on the antioxidant activity of milk proteins. *J*
50 *Dairy Sci* **96**:4899-4911; 2013.
- 51 [56] Borrelli, R. C.; Fogliano, V. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol*
52 *Nutr Food Res* **49**:673-678; 2005.

- 1 [57] Rurian-Henares, J. A.; Morales, F. J. Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia*
- 2 *coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. *J Agric Food Chem* **56**:2357-2362; 2008.
- 3
- 4

Table 1

	Target	Primers and Probe	Sequences (5'-3')	Reference
TaqMan System				
	<i>Bifidobacterium</i> group	F-Bifid 09c	CGGGTGAGTAATGCGTGACC	
		R-Bifid 06	TGATAGGACGCGACCCCA	Mayeur et al; 2013
		P-Bifid	6 FAM CTCC TGGAAACGGGTG	
SyberGreen System				
	All Bacteria	F-Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG	
		R-Prok1492	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	Mayeur et al; 2013
	<i>Bacteroidetes</i>	BactF	CCTWCGATGGATAGGGGTT	Etreiki et al; 2012
		BactR	TCCCCAGGTGGAATACTTAACG	
	<i>Lactobacillus/Leucon ostoc</i> / <i>Pediococcus</i> group	F-lacto05	AGCAGTAGGGAATCTTCC	Mayeur et al; 2013
		R-lacto04	CGCCACTGGTGTTCYTCCATATA	
	<i>Firmicutes</i>	FirmF	ACCCGCGTCTGATTAGCTAGTT	Etreiki et al; 2012
		FirmR	CCTCTCAGGCCGGCTACTG	
CE-SSCP	Eubacteria	W49 W104	AGGTCCAGACTCCTACGGG 6FAM-TACCGCGGCTGCTGGCAC	

Table 2

Gene	Sequences
iNOS	5' AGAGCCTCTGGACCTCAACA 3' (F)
	5' CTCACAGCAGAGTTCCACCA 3' (R)
GPX	5' GCTCGGTGTATGCCTTCTCT 3' (F)
	5' AGCGACGCTACGTTCTCAAT 3' (R)
NFκB	5' CCCATGTAGACAGCACCACCTATGAT 3' (F)
	5' ACAGAGGCTCAAAGTTCTCCACCA 3' (R)
β-actine	5' GGATGCAGAAGGAGATCACG 3' (F)
	5' GACAGGTGGAAGGTCGTCTA 3' (R)

Table 3

	GPX	PE-SOD	CAT	NFkB	iNOS
Firmicutes	0,68 ^b	0,48	- 0,72 ^b	0,08	-0,51
Lactobacilli	0,04	0,69 ^a	- 0,11	-0,75 ^b	-0,03
Bacteroidetes	0,55	-0,35	-0,72 ^a	0,28	-0,10
Diversity (log shannon)	-0,54	-0,37	0,22	-0,50	0,03
Diversity (Log simpson)	0,37	0,26	-0,09	0,38	-0,03
Diversity (Richness)	-0,60 ^a	-0,43	-0,46	-0,61 ^a	-0,60 ^a

Figure 1

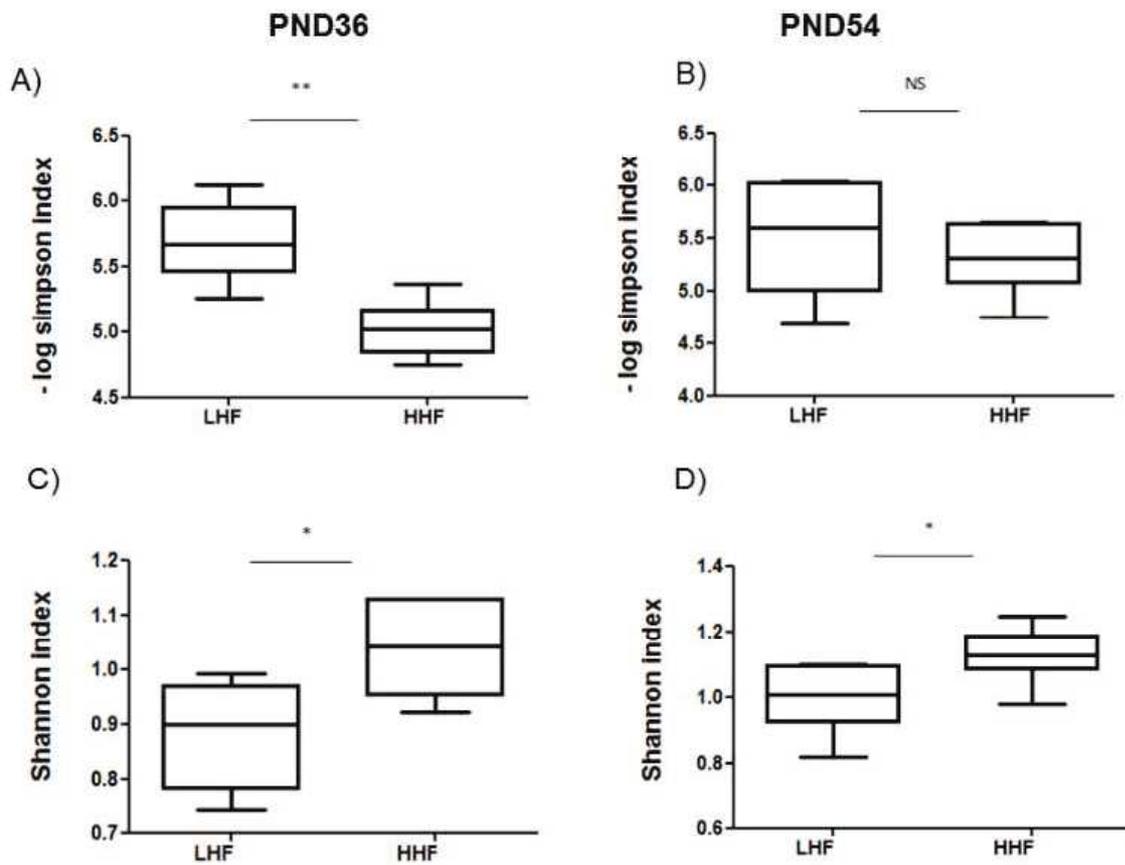


Figure 1B

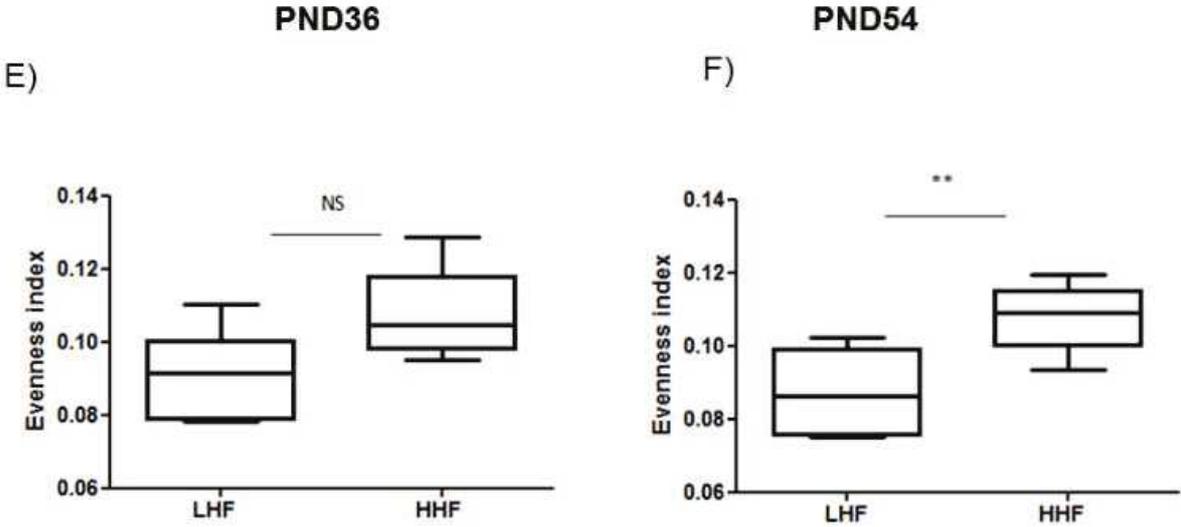


Figure 2

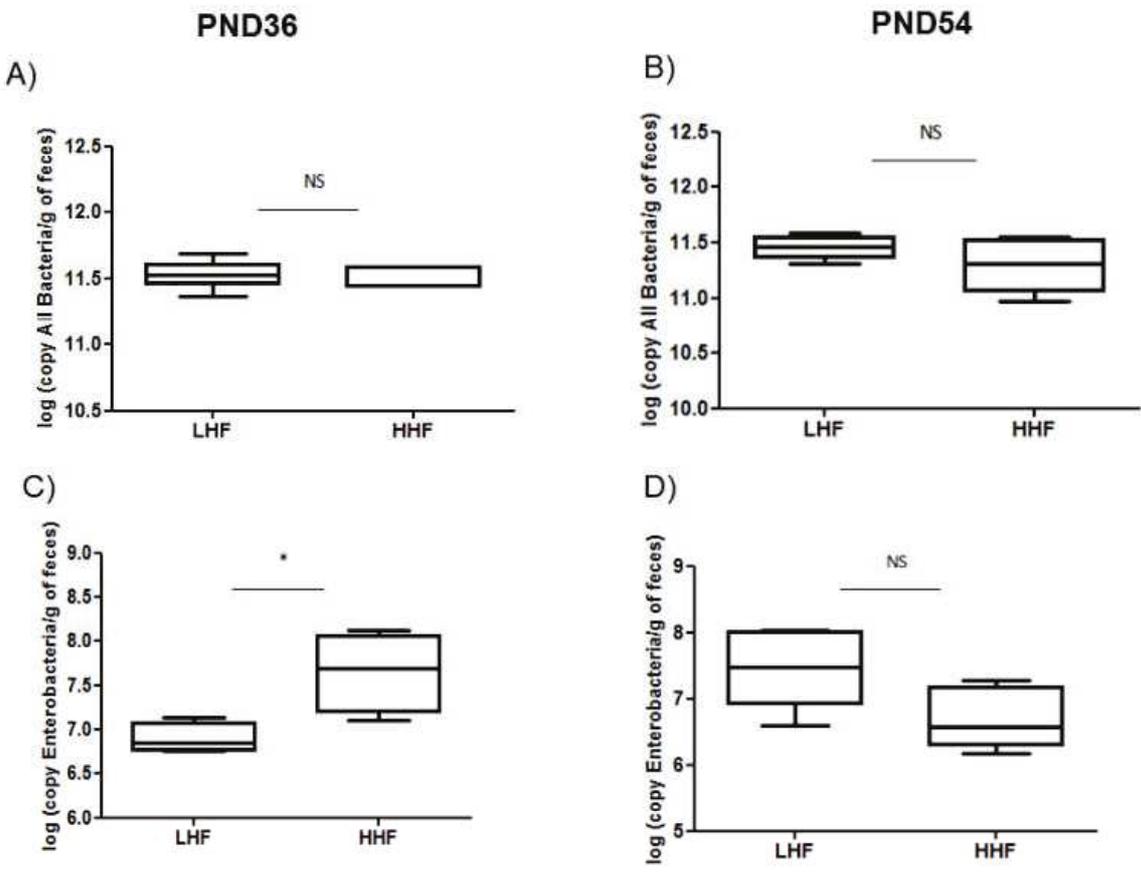


Figure 2B

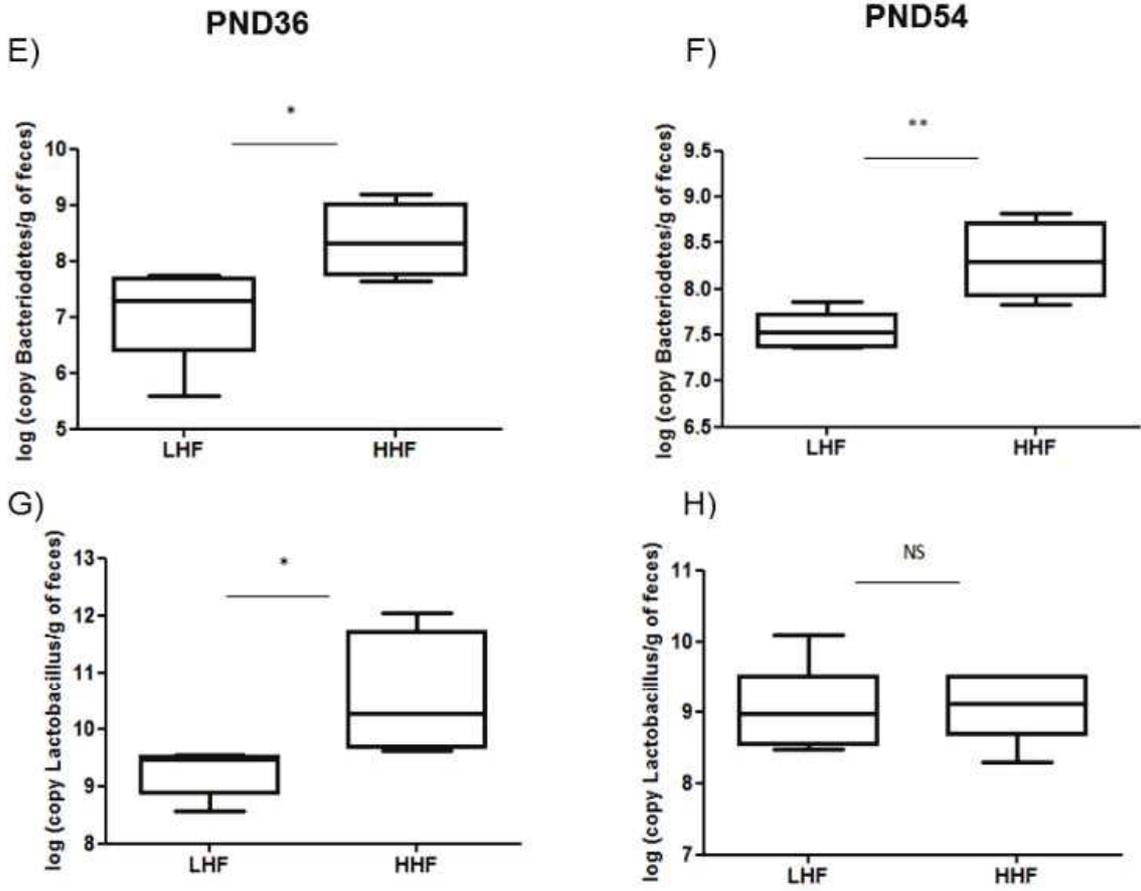


Figure 2C

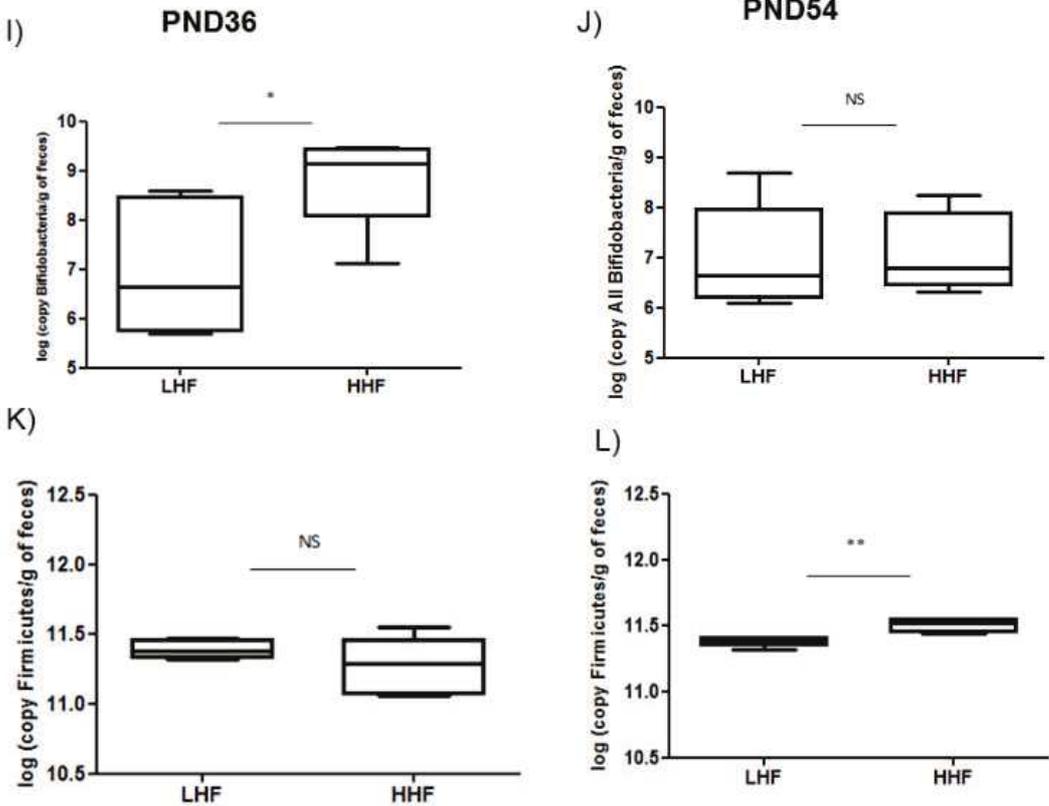
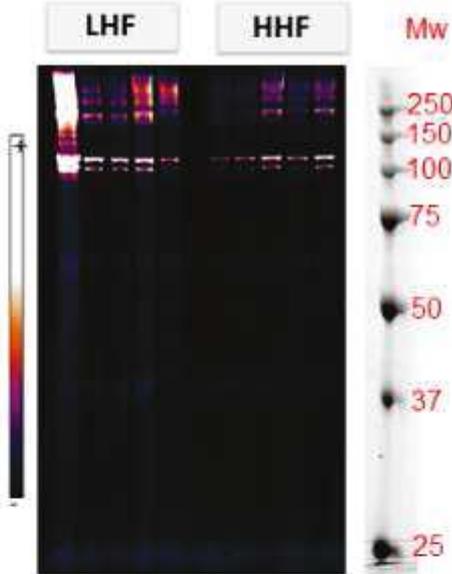


Figure 3

A)



B)

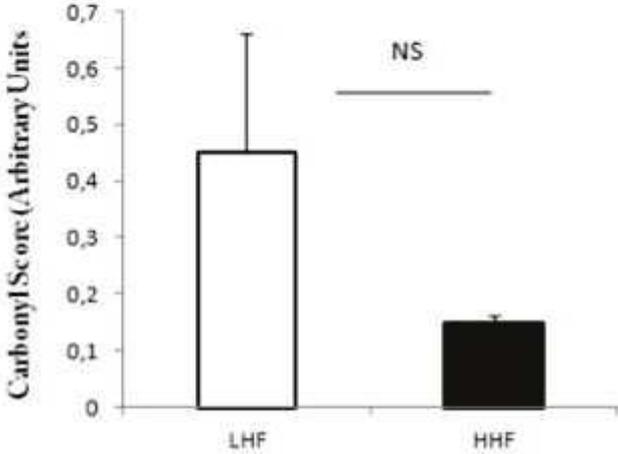


Figure 4

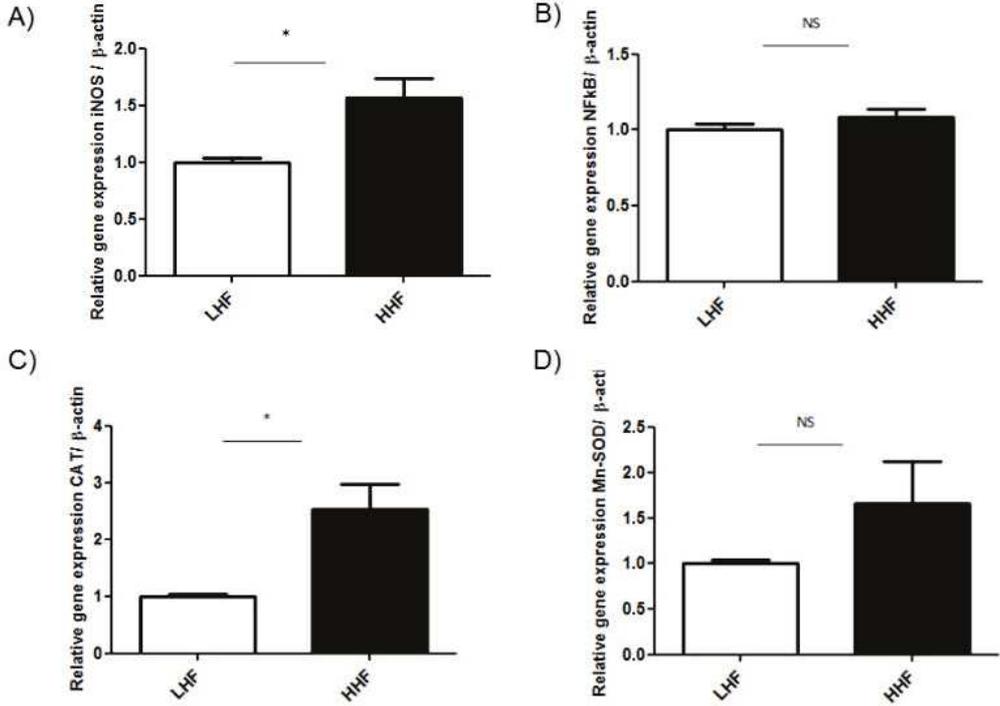


Figure 4B

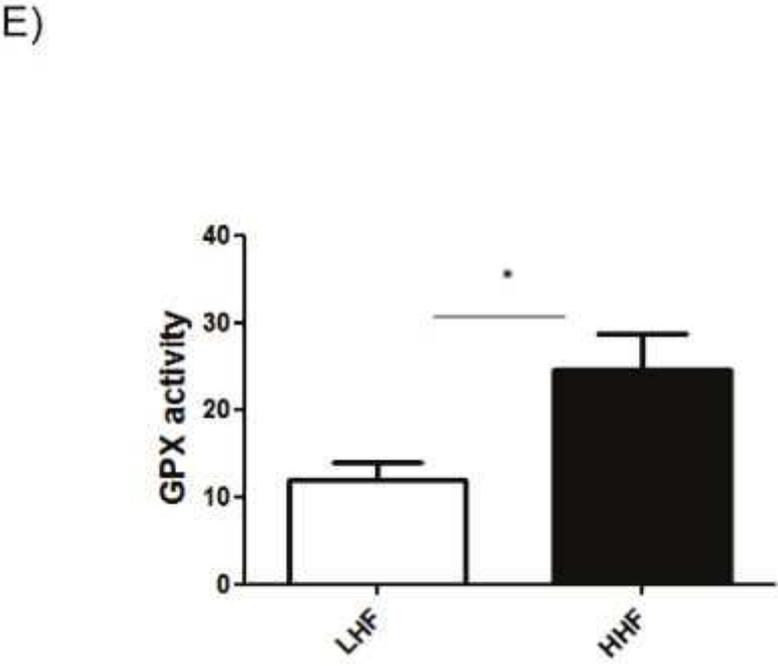
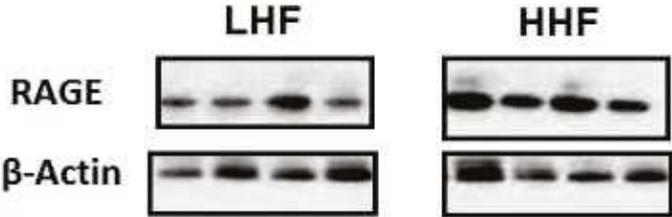


Figure 5

A)



B)

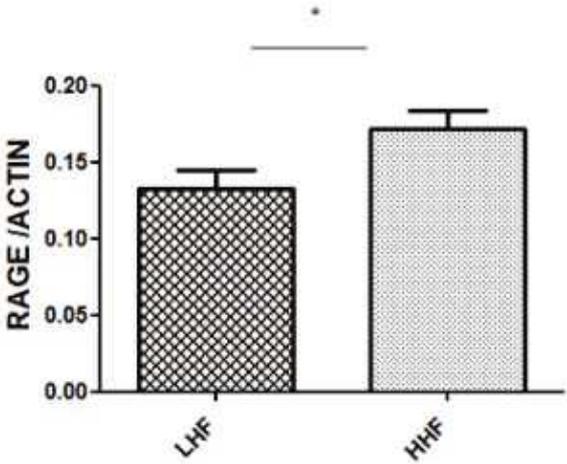
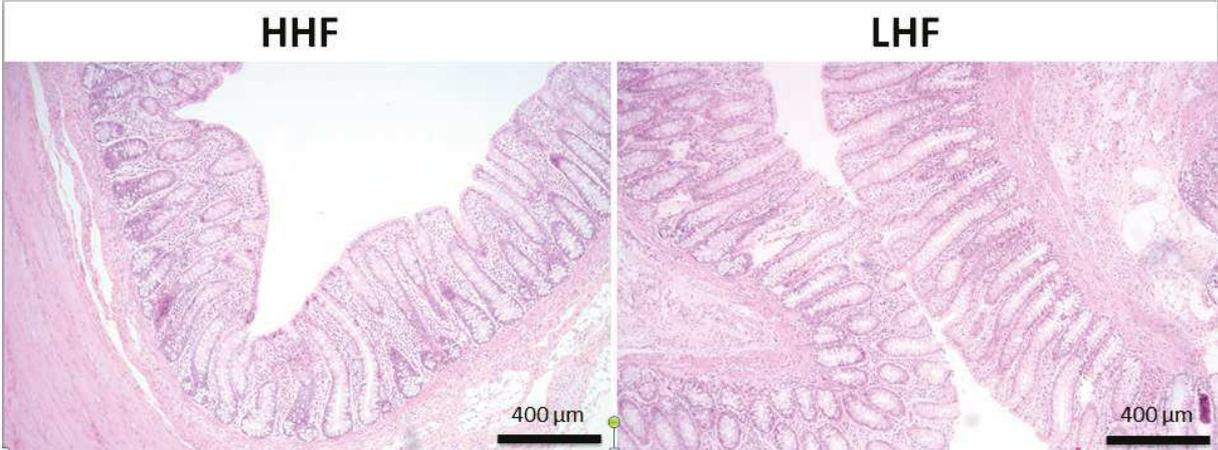


Figure 6



IV.4 Résultats complémentaires:

IV.4.1 Evolution des populations bactériennes avec l'âge

Indépendamment du régime et du stade de développement, une répartition normale des populations bactériennes est observée avec le phylum des *Firmicutes* qui apparaît bien majoritaire suivi du phylum des *Bacteroidetes*. La flore lactique est très importante et est classiquement observée comme supérieure par rapport aux *Bifidobactéries*. Les *Entérobactéries* sont sous-dominantes. L'analyse selon l'âge montre des différences significatives entre les deux stades étudiés pour les phyla des *Firmicutes*, de la flore lactique et des *Bifidobactéries*: Une diminution significative de la flore lactique et des *Bifidobactéries* est observée à 54 jours par rapport à l'âge de 36 jours alors qu'une augmentation des *Firmicutes* est observée au même stade. En revanche, aucune différence en nombre de copies de *Bacteroidetes*, d'*Enterobactéries* ou en flore totale n'a été observée avec l'âge démontrant ainsi que certaines populations bactériennes restent stables au cours du développement. La diversification alimentaire a certainement permis de contribuer à l'augmentation des *Firmicutes* (Figure 37). Il est également important de souligner, comme le montre Tableau 8, que le microbisme précoce des animaux a influence l'installation d'un profil microbien tardif (de forts coefficients de corrélations entre les différents indices de diversité entre les deux âges ont été observés). Les analyses supplémentaires par CE-SSCP montrent que ces différences des communautés bactériennes en fonction de l'âge ne sont pas dépendantes de la richesse (nombre de pics) en espèces sous dominantes mais de leurs abondances (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Notons que l'abondance des espèces minoritaires est également un facteur de variation important entre les animaux HHF et LHF.

Par ailleurs afin de comparer les similitudes entre les populations bactériennes des animaux, nous avons établi une classification hiérarchique selon le traitement thermique du lait et

l'âge. Le dendrogramme est montré dans la Figure 37. La mesure de similarité entre les échantillons a été estimée par le coefficient de Bray-Curtis, suivie par une analyse de la variance. Une bonne séparation de la structure des communautés bactériennes selon l'âge a été mise en évidence (P=0.00338).

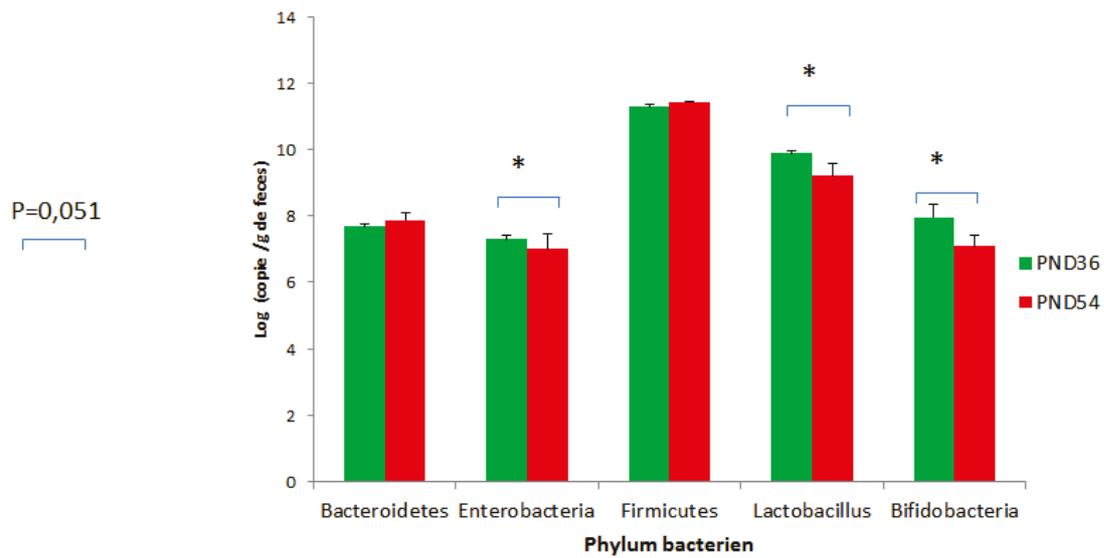


Figure 36: Répartition des différents phyla bactériens aux 2 stades PND36 et PND 54

Tableau 8 : Coefficients de corrélation entre les indices de diversité à PND36 et PND54 chez le porcelet RCIU

		Coef de Pearson	P value	Coeff spearman	P value	Coeff Kendal	P value
Shannon PND54	Shannon PND36	0,883	0,002	0,917	0,001	0,833	0,001
Simpson PND54	evenness PND36	-0,895	0,001	-0,833	0,008	-0,667	0,013
Shannon PND54	evenness PND36	0,818	0,007	0,767	0,021	0,667	0,013

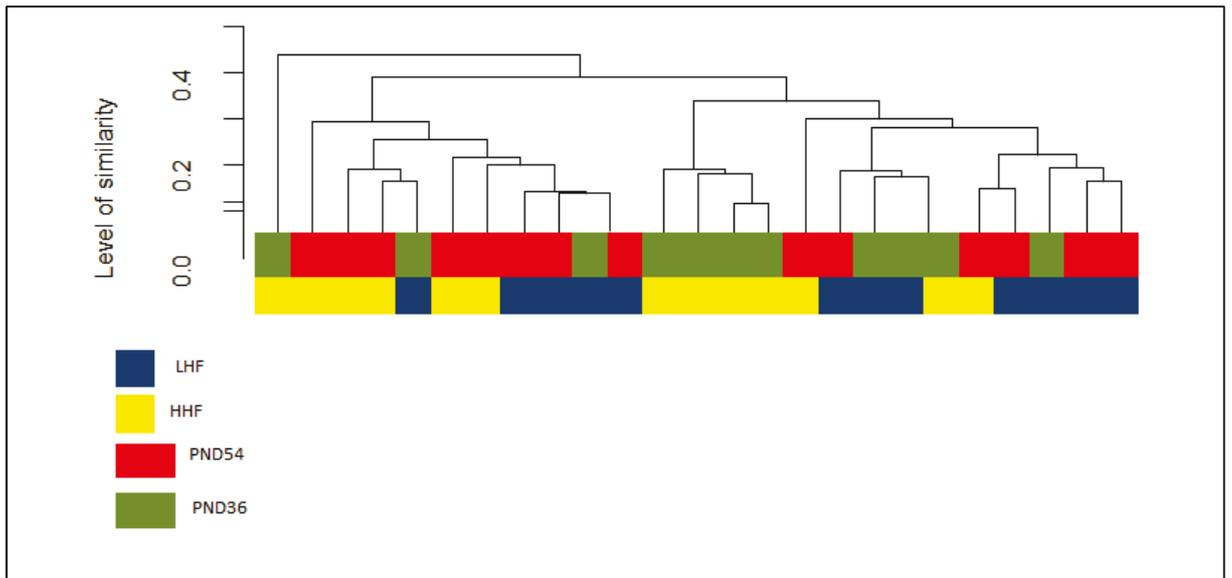


Figure 37 : Dendrogramme représentant la classification héarchique selon le traitement thermique du lait et de l'âge

CHAPITRE V: Effets des AGEs
sur le dysfonctionnement
de la cellule pancréatique :
Article 3

Actual exposure to a precursor of advanced glycation end products induces a dual effect on the rat pancreatic islets function, ELMHIRI G. Int J Endocrinol.2014:378284. Doi: 10.1155/2014/378284. Epub 2014 Nov 17.

V.1 Introduction

Dans cette étude nous avons émis l'hypothèse que les AGEs seraient impliqués dans la programmation du diabète de type 2. Cette question a été dictée par de récents travaux développés par une équipe américaine impliquant les AGEs des formules dans l'insulino-résistance chez l'enfant à 12 mois (Mericq et al, 2010). Selon cette étude, l'augmentation précoce du MG chez la mère au niveau sérique est un bon indicateur du stress oxydant, de l'inflammation et de l'installation du diabète chez l'enfant. Il en va de même pour le niveau de CML et l'adiposité mesurés à un an: les auteurs ont mis en évidence une corrélation négative entre le niveau de CML plasmatique chez l'enfant à la naissance et le niveau d'adiponectine à l'âge de 12 mois (Mericq et al, 2010). Plus récemment, l'étude de (Klenovics et al, 2013) est venue infirmer ces résultats démontrant qu'il n'existe aucun lien entre les AGEs des formules infantiles et l'état d'insulino-résistance chez les enfants à l'âge de 12 mois. Au vu de ces études, la question de l'effet de la consommation des AGEs des formules infantiles sur le développement du diabète à l'âge adulte est loin d'être élucidée et mérite d'être étudiée.

Qui de la CML ou du MG est responsable du diabète et de ses complications?

Les travaux de Vlassara (Vaisse et al, 1996; Vlassara et al, 1985; Vlassara et al, 2002; Vlassara et al, 2009; Vlassara et al, 1992; Vlassara & Uribarri, 2014) sous-tendent que, de par sa grande réactivité et du fait qu'il soit un des sous-produits de la glycolyse, le MG serait fortement responsable du diabète. Dans des conditions physiologiques, sa détoxification se fait via le système de la glyoxalase 1 (GLO1) et la glyoxalase 2 (Glo2) (Maessen et al, 2015). Chez le diabétique, ce système semble défaillant du fait de la surcharge en MG dans le plasma et de la diminution des performances de détoxification par le système de défense antioxydant. Ces résultats suggèrent l'implication majeure du MG dans le déséquilibre du système redox cellulaire chez les diabétiques (Maessen et al, 2015).

En se basant sur les études de Vlassara (Vaisse et al, 1996; Vlassara et al, 1985; Vlassara et al, 2002; Vlassara et al, 2009; Vlassara et al, 1992; Vlassara & Uribarri, 2014), nous avons mené différentes expériences (porc et rongeur) pour déterminer si les AGEs

alimentaires sont impliqués dans les phénomènes de programmation de la résistance à l'insuline et du diabète à l'âge adulte.

Sur le modèle porcin RCIU

Nous avons isolé, les pancréas des porcs âgés de 54 jours, ayant reçu les deux régimes HHF et LHF pour déterminer les effets de la consommation des AGEs sur le nombre des cellules α et β pancréatiques. Des prélèvements sanguins ont également été réalisés au même stade pour déterminer le statut glycémique et insulinémique chez des porcelets. Cependant en raison de pannes électriques récurrentes au laboratoire, les analyses sur le pancréas n'ont pas pu être établies. Seuls les dosages de glycémie ont été réalisés : ils montrent une tendance à la baisse de la glycémie chez les animaux HHF à l'âge de 54 jours (2.56 ± 1.64 VS 1.74 ± 1.06 , $p= 0,0508$).

Sur le modèle rongeur: Etude de l'effet des AGEs sur la réponse de la cellule β pancréatique (ex-vivo).

Une collaboration avec l'Université de Maringa (Brésil) dans le « Laboratory of Secretion Cell Biology » nous a permis de mettre en place, à partir du pancréas de rat adulte, la technique d'isolement des îlots de Langerhans et leur dénombrement. La Figure 38 résume la technique développé au laboratoire.

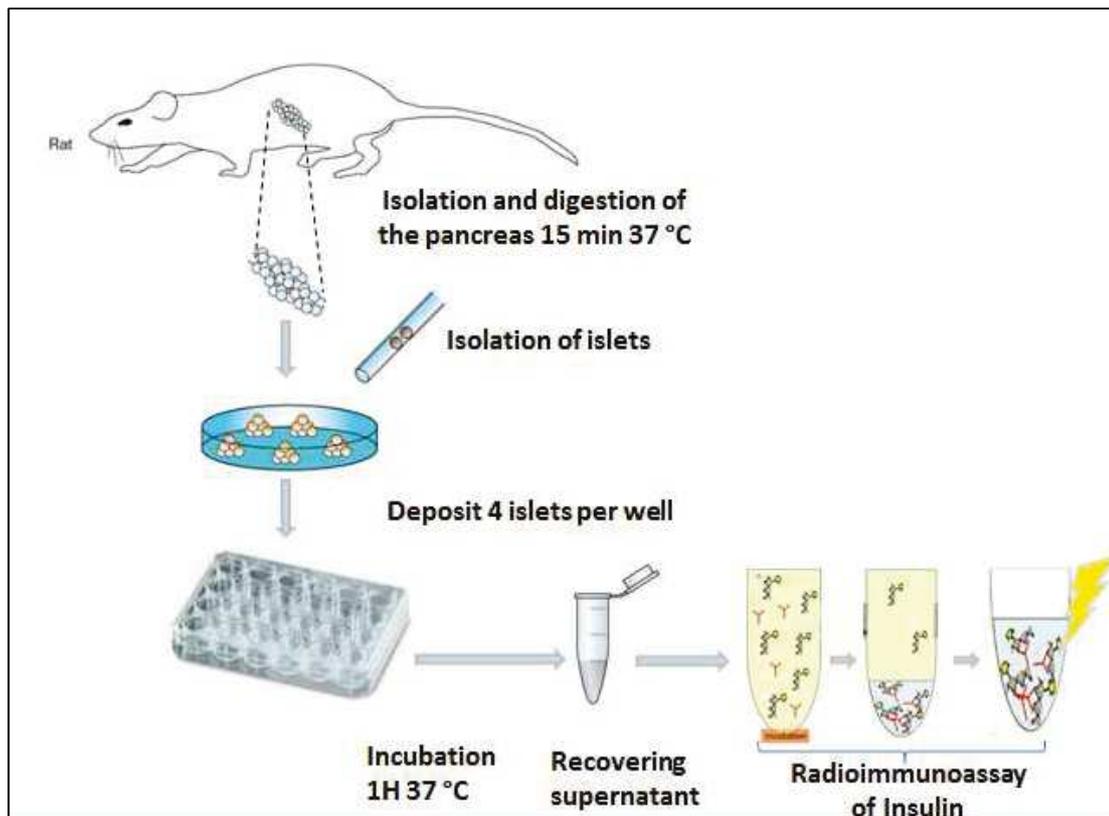


Figure 38 : Isolement des îlots de Langerhans chez le rat.

V.2 Résultats marquants

Nous avons testé, sur des cellules pancréatiques isolées à partir des îlots de Langerhans de rats adultes (90 jours), les cinétiques de dose réponse aux AGEs (CML et MG). Les premiers résultats montrent une modulation de la synthèse de l'insuline uniquement par le MG.

De plus, nous avons montré qu'en stimulant les îlots pancréatiques avec une concentration de glucose de base (5,6 mM), le MG induit une augmentation significative de la sécrétion d'insuline. En revanche, en présence de concentrations élevées de glucose (8,3 mM et 16,7 mM), la sécrétion d'insuline est fortement inhibée. En présence de potassium, de forskoline et d'épinéphrine, le MG stimule la sécrétion d'insuline, tandis qu'en présence de l'acétylcholine et de la leucine, le MG a induit une diminution de la sécrétion de cette hormone. Notre étude *ex-vivo* révèle que la sécrétion d'insuline par la cellule β est modulée positivement ou négativement par le MG selon les conditions d'incubation testées. Cette modulation est très dépendante de l'environnement métabolique cellulaire dans lequel se trouve la cellule au moment de l'exposition.

Nous avons décidé de poursuivre nos études sur les effets du MG sur la sécrétion d'insuline en modulant les niveaux de stimulation glycémique (variation des concentrations de stimulation en glucose en différents médiateurs de la réponse insulinémique), notre but étant de déterminer les effets du MG sur la modulation de la réponse insulinémique dans des conditions physiologiques très différentes (Figure 39).

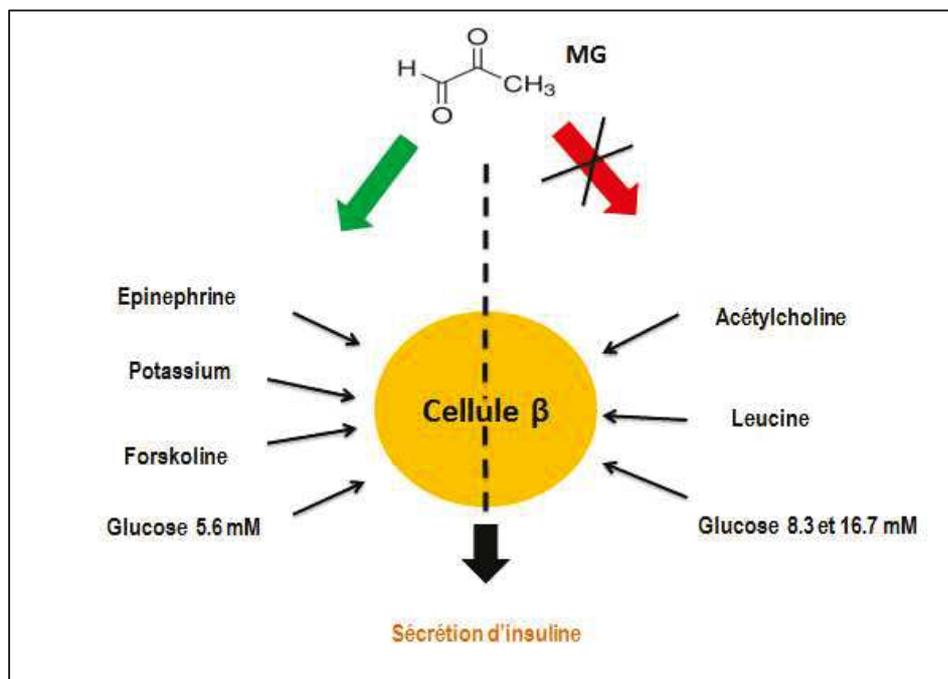


Figure 39 : Schéma récapitulatif du double effet modulateur du MG sur la sécrétion d'insuline au sein de la cellule β pancréatique chez le rat adulte

Research Article

Acute Exposure to a Precursor of Advanced Glycation End Products Induces a Dual Effect on the Rat Pancreatic Islet Function

Ghada Elmhiri,¹ Luiz Felipe Barella,² Didier Vieau,³ Sylvaine Camous,⁴ Paulo C. F. Mathias,² and Latifa Abdennebi-Najar¹

¹ Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, EGEAL-UP 2012.10.101., 19 rue Pierre Waguet, 60026 Beauvais Cedex, France

² Laboratory of Secretion Cell Biology, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology, State University of Maringá, 87020-900 Maringá, PR, Brazil

³ Environnement Périnatal et Croissance (EA4489), Equipe Dénutritons Maternelles Périnatales, SN4, Université de Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

⁴ INRA, UMR1198, Biologie du Développement et Reproduction, 78352 Jouy en Josas, France

Correspondence should be addressed to Latifa Abdennebi-Najar; latifa.najar@lasalle-beauvais.fr

Received 14 July 2014; Accepted 20 October 2014; Published 17 November 2014

Academic Editor: Dario Iafusco

Copyright © 2014 Ghada Elmhiri et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Aim. Chronic diseases are the leading cause of death worldwide. Advanced glycation end products, known as AGEs, are a major risk factor for diabetes onset and maintenance. Methylglyoxal (MG), a highly reactive metabolite of glucose, is a precursor for the generation of endogenous AGEs. **Methods.** In this current study we incubated *in vitro* pancreatic islets from adult rats in absence or presence of MG (10 μ mol/l) with different concentrations of glucose and different metabolic components (acetylcholine, epinephrine, potassium, forskolin, and leucine). **Results.** Different effects of MG on insulin secretion were evidenced. In basal glucose stimulation (5.6 mM), MG induced a significant ($P < 0.05$) increase of insulin secretion. By contrast, in higher glucose concentrations (8.3 mM and 16.7 mM), MG significantly inhibited insulin secretion ($P < 0.05$). In the presence of potassium, forskolin, and epinephrine, MG enhanced insulin secretion ($P < 0.05$), while when it was incubated with acetylcholine and leucine, MG resulted in a decrease of insulin secretion ($P < 0.05$). **Conclusion.** We suggest that MG modulates the secretion activity of beta-cell depending on its level of stimulation by other metabolic factors. These results provide insights on a dual acute effect of MG on the pancreatic cells.

1. Introduction

Glycemia and diabetes are rising globally accounting 347 million people worldwide. The study of type 2 diabetes (T2D) has been stimulated due to its growing pandemic and intricate physiopathology, in search of better ways of prevention and treatment of the T2D and its associated complications [1]. Among the several studies to explain the different causative factors and their roles in the onset and maintenance of the T2D and pancreatic islet dysfunctions, the formation of the advanced glycation end products (AGEs) has gained significant importance [2]. For example, it has been reported

that patients with diabetes present increased serum concentrations of AGEs compared with nondiabetic patients [3].

AGEs are formed and accumulated by endogenous and exogenous ways. Among the mechanisms, these molecules can increase their intracellular concentrations through the autooxidation of glucose resulting in glyoxal [4] that can undergo a final fragmentation producing the methylglyoxal [5]. Glyoxal and methylglyoxal interact with amino groups of intracellular and extracellular proteins to produce the AGEs. In addition to the prevailing formation of AGEs under physiological conditions and their increase under conditions of hyperglycemia and oxidative stress [6], these products

are also introduced in the organism by means of exogenous sources, such as tobacco and diet. The diet is considered the main exogenous source of AGEs and is associated with the development of several pathologies such as diabetes [7]. Food preparation methods using high temperatures (frying, roasting, and grilling) potentialize the production of AGEs present in the diets; moreover, high-fat foods are the main contributors to the formation of AGEs in the diets [8]. Thus, both the endogenous and exogenous AGEs influence the installation and progression of pathologies like T2D.

The pancreatic islet insulin secretion is highly regulated by glucose and secretagogues. Glucose is responsible for the triggering of insulin release while the secretagogues may amplify or inhibit the release depending on their interactions. The triggering and amplifying pathways were widely reviewed in the literature [9–12]. Recent studies have shown that AGEs long-term exposure may impair the beta-cell function by inducing apoptosis or decreasing the insulin secretion [13, 14]. However, the specific sites of interactions of the AGEs on the different pathways of insulin secretion remain to be elucidated [15].

Our current study highlights the acute effect of incubation of a precursor of AGEs, methylglyoxal (MG), on the insulin secretion triggered by glucose and modulated by different secretagogues. Our findings revealed that MG exerts a dual role on the insulin secretion depending on both glucose concentration and the type of secretagogue.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. The experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 1986 (86/609/EEC) and approved by the French Departmental Direction of Veterinary Services Committee.

Ten adult Wistar rats were purchased from Harlan Laboratories (Gannat, France) and housed two per cage. The animal facility rooms were maintained on a dark/light schedule (12 h/12 h, light on at 08 h) and controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Animals were maintained with free access to food (regular rat chow diet) and tap water. After a week of acclimation, the rats weighing around 350 grams were used to the subsequent experiments.

2.2. Isolation of the Pancreatic Islets. Pancreatic islets were isolated by the collagenase method as previously described [16], with adaptations. The animals were decapitated and the abdominal wall was cut open. Following, 8 mL of Hanks buffered saline solution (HBSS; (mM): NaCl, 136.9; KCl, 5.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.81; Na_2HPO_4 , 0.34; KH_2PO_4 , 0.44; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.26; NaHCO_3 , 4.16; glucose, 0.06; BSA, 15); and ((v/v; 95% O_2 + 5% CO_2 , mixed)/10 min, pH 7.4) containing ((w/v) 0.1% collagenase type XI, 5% BSA and 0.6% N-(2-hydroxyethylpiperazine)-N'-(2-ethanesulfonic acid; HEPES); Sigma-Aldrich) was injected into the rats' common bile duct. The inflated pancreas with collagenase was incubated at 37°C . The pancreas was washed with HBSS and the islets were hand-picked with the aid of a stereomicroscope.

2.3. Functional Study of the Insulin Secretion. To adapt the pancreatic islets, they were preincubated for 60 min in 1 mL of normal Krebs-Ringer solution ((mM): NaCl, 115; NaHCO_3 , 24; KCl, 1.6; $\text{MgCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1; BSA, 15; pH 7.4) containing 5.6 mmol/L glucose. This solution was gassed with (v/v) 95% O_2 C5% CO_2 (mixed) to maintain pH 7.4. After the preincubation, groups of 4 islets were incubated with different concentrations of glucose (5.6, 8.3, and 16.7 mM) for an additional 60 min.

To study the different amplifying/inhibiting pathways of insulin secretion, islets were incubated (after the preincubation period) for further 60 min with 8.3 mM of glucose plus $10 \mu\text{M}$ of acetylcholine in the presence of $10 \mu\text{M}$ of neostigmine to avoid the acetylcholinesterase action; or 16.7 mM of glucose plus $1 \mu\text{M}$ of epinephrine; or 5.6 mM of glucose plus 40 mM of K^+ ; or 8.3 mM of glucose plus $10 \mu\text{M}$ of forskolin; or 5.6 mM of glucose plus 10 mM of leucine. All the incubations were also tested in presence of $10 \mu\text{M}$ of methylglyoxal. Doses were tested before or chosen from the literature to the optimal induction/inhibition of the insulin secretion.

The supernatants from the incubations were collected and stored for posterior insulin measurements using a radioimmunoassay method. All the pharmacological compounds used for the study were purchased from Sigma-Aldrich.

2.4. Statistical Analysis. Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Student's *t*-test was performed using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

To study the effect of MG on insulin release triggered by different concentrations of glucose, cells were incubated with 5.6 mM, 8.3 mM, and 16.7 mM of glucose in presence or absence of MG (10 mM). As shown in Figure 1, at basal glucose concentration, MG induced an increase of 91% ($P < 0.01$) in the glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). However, at 8.3 and 16.7 mM of glucose, the insulin secretion in presence of MG was reduced by 71% and 42% ($P < 0.01$), respectively.

Secondly, we studied the effect of MG on islets insulin secretion in presence of different secretagogues. Results shown in Figures 2 and 3 have been expressed as a percentage from the respective basal glucose concentration. In presence of 8.3 mM of glucose, acetylcholine amplified the insulin secretion by 160% ($P < 0.001$), and the presence of MG decreased the acetylcholine-increased insulin secretion by 27% ($P < 0.001$), compared with 8.3 mM of glucose. In presence of 16.7 mM of glucose, epinephrine decreased the insulin secretion by 76% ($P < 0.001$) and the addition of MG resulted in a slight decrease (67% compared with 16.7 mM of glucose, $P < 0.001$) of the epinephrine-induced inhibition of GSIS. In Figure 3, the GSIS was increased by 85% ($P < 0.001$) in presence of K^+ and 5.6 mM of glucose, and the addition of MG induced by 177% ($P < 0.001$) the insulin secretion compared with 5.6 mM of glucose. Forskolin induced by 89% ($P < 0.001$) the insulin secretion in presence of 8.3 mM of

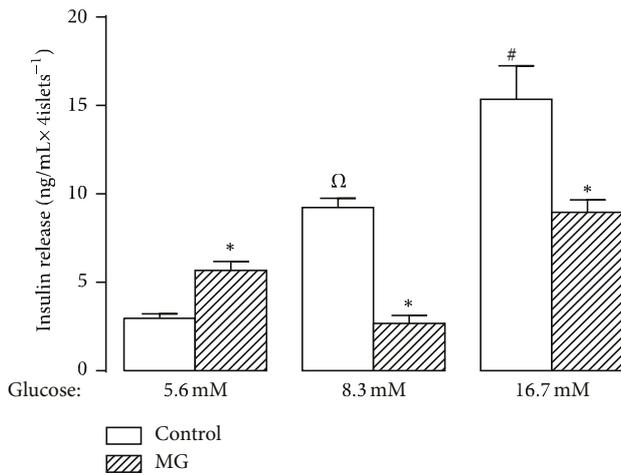


FIGURE 1: Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Insulinotropic effect of GSIS from isolated pancreatic islets in absence or presence of methylglyoxal. Insulin secretion was stimulated by increasing concentrations of glucose, as indicated below the x-axis. Bars represent the mean \pm S.E.M. * $P < 0.01$ compared with the respective control group; $^{\Omega}P < 0.01$ compared with 5.6 or 16.7 mM of glucose; $^{\#}P < 0.01$ compared with 5.6 or 8.3 mM of glucose.

glucose, while the addition of MG resulted in further increase of around 3-fold ($P < 0.001$). Finally, in presence of 5.6 mM of glucose, leucine increased the insulin secretion by 85% ($P < 0.001$), while in presence of MG this leucine-induced increase of insulin secretion was of 32% ($P < 0.05$) compared with 5.6 mM of glucose.

4. Discussion

Our study provides evidence to support the hypothesis that MG affects the insulin secretion in a dual manner. We have shown that short exposure of a low concentration of MG leads to an imbalance of insulin secretion at both basal and high glucose concentrations as well as in the presence of acetylcholine, epinephrine, potassium, leucine, and forskolin. These results indicate that different pathways are involved in AGEs regulation of insulin secretion and that their mode of action is dependent either on glucose concentration or on the nature of secretagogue applied in the cells. In agreement with a previous study [17], our findings support the idea of a dual effect of AGEs in the regulation of insulin secretion.

Glucose is the main nutrient that initiates the insulin secretion on pancreatic islets. It is internalized by glucose transporters 2 (GLUT2) present in the beta-cell surface. Briefly, within the cells, the glucose is metabolized by oxidative glycolysis, which leads to a rise of the ATP-to-ADP ratio. The increased levels of ATP result in the closure of ATP-sensitive potassium channels, which leads to a depolarization of the membrane and subsequent opening of voltage-dependent calcium channels and the influx of calcium resulting in the rise of cytoplasmic-free calcium concentration and activation of the exocytotic machinery [9]. The incubation of isolated islets with glucose stimulates the insulin secretion in a concentration-dependent manner [18]. Interestingly, when

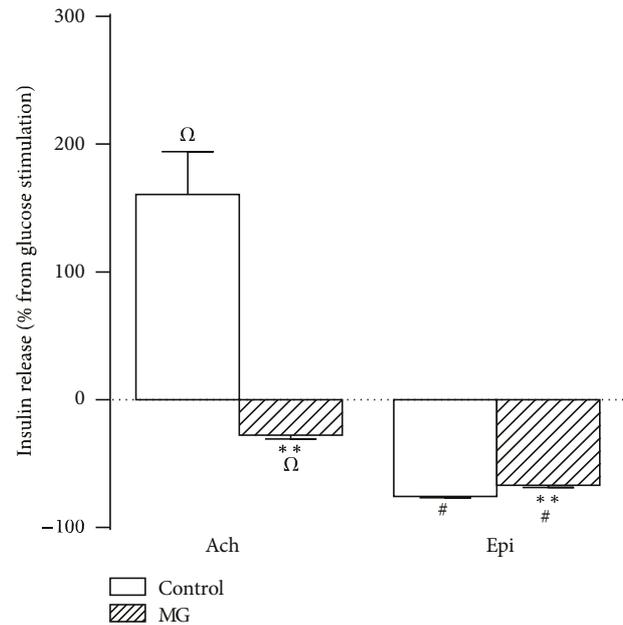


FIGURE 2: Effect of acetylcholine or epinephrine on GSIS. Insulin secretion was stimulated or inhibited by acetylcholine or epinephrine, as indicated below the x-axis, in absence or presence of methylglyoxal. Bars represent the mean \pm S.E.M. of the percentage of insulin release compared with their respective glucose concentrations, which are represented by the line from 0. Ach, $10 \mu\text{M}$ of acetylcholine in presence of $10 \mu\text{M}$ of neostigmine + 8.3 mM of glucose; Epi, $1 \mu\text{M}$ epinephrine + 16.7 mM of glucose. $^{\Omega}P < 0.001$ compared with 8.3 mM of glucose; $^{\#}P < 0.001$ compared with 16.7 mM of glucose; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ compared with the respective control group.

the islets were incubated with basal concentration of glucose and AGEs, the insulin release was increased. On the other hand, islets incubated with higher glucose concentrations and AGEs exhibited a great inhibition of the insulin release. These data indicate a possible interaction of AGE in a dual manner on the regulation of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). This AGE regulation could be related to the metabolic state of the cell. A previous study has shown that MG exerts a major damaging effect on INS-1E cells impairing both insulin action and secretion, which includes impairment of the insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor (IRS) and activation of the glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) with its reduced phosphorylation response to insulin [19].

To further investigate the AGE action on insulin secretion, we investigated the involvement of ATP-regulated potassium channels (K_{ATP}^+). The blocking of the K_{ATP}^+ by high extracellular potassium concentration led to increased insulin secretion even in low levels of glucose, as seen in the literature and in our results. Furthermore, the addition of AGEs induced even higher secretion in combination with extracellular potassium. An amplifying pathway augments insulin secretion without a reduced K_{ATP}^+ permeability (K_{ATP}^+ independent pathway), indicating that glucose controls the insulin secretion by other additional pathways [9, 20, 21]. This suggests that AGEs recruit the K_{ATP}^+ independent pathway.

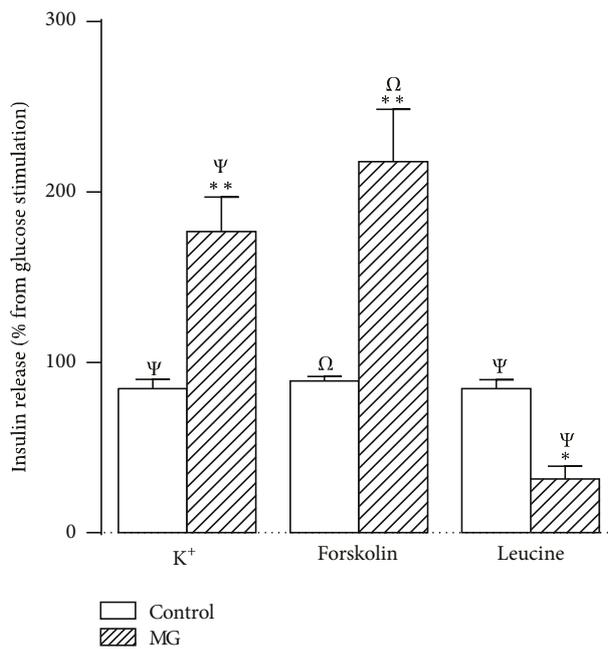


FIGURE 3: Effect of K⁺, forskolin, or leucine on GSIS. Insulin secretion was stimulated or inhibited by K⁺, forskolin, or leucine, as indicated below the x-axis, in absence or presence of methylglyoxal. Bars represent the mean \pm S.E.M. of the percentage of insulin release compared with their respective glucose concentrations, which are represented by the line from 0. K⁺, 40 mM of potassium + 5.6 mM of glucose; forskolin, 10 μ M of forskolin + 8.3 mM of glucose; leucine, 10 mM of leucine + 5.6 mM of glucose. Ψ $P < 0.001$ compared with 5.6 mM of glucose; Ω $P < 0.001$ compared with 8.3 mM of glucose; # $P < 0.001$ compared with 16.7 mM of glucose; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.001$ compared with the respective control group.

Acetylcholine is one potent modulator of GSIS through its action on cholinergic muscarinic receptors present throughout the insulin secreting cells. When incubated with glucose and acetylcholine, the insulin release was highly increased. Otherwise, when these cells received also the AGE compound, they exhibited a rough decrease in insulin secretion, even lower than the secretion exhibited by islets only in presence of glucose. In agreement with previous studies, it seems that AGEs activate pathways of beta-cell damage, through generation of mitochondrial superoxide, which can lead to an impairment of insulin secretion [17, 22]. The cholinergic muscarinic receptors are classified as G protein coupled receptors (GPCR) and are regulated by phosphorylation following acetylcholine stimulation. These receptors couple with various downstream pathways such as the increase or decrease in cyclic AMP (cAMP) levels and stimulation of phospholipase C (PLC) with the formation of IP3 [23, 24]. In the same line, the adrenergic receptors are also formed of GPCR, but are targets of the catecholamines, and islets incubated with epinephrine presented a great inhibition of GSIS. On the other hand, the addition of AGEs caused a slight decrease in the epinephrine-induced inhibition of insulin release. To further explore the involvement of AGEs and cAMP levels, we activated the adenylyl cyclase (AC) with

forskolin [25], which resulted in increased insulin secretion when islets were incubated with only 8.3 mM of glucose. Adding the AGEs to this AC-activated pathway assay resulted in around 2-fold more insulin release. It is evident that AGEs may have a cross-talk interaction with the AC downstream pathway. Whether the AGEs are acting or not in those downstream pathways remains to be further studied.

We further analyzed the insulin secretion stimulated by leucine and MG. Leucine is known to stimulate insulin release in normal beta-cells by two mechanisms. Firstly, by degradation through transamination pathway producing α -ketoisocaproate, a metabolite which is a potent secretagogue allowing stimulation of insulin secretion through subsequent mitochondrial oxidation. Secondly, by the allosteric activation of glutamate dehydrogenase resulting in increased glutaminolysis, which also stimulates mitochondrial oxidation. Both mechanisms lead to an increase of the metabolic flux rate through the citric acid cycle, which increases the ATP production [26–28]. Our findings show that insulin release was increased in a basal concentration of glucose in presence of leucine; however, in the presence of AGEs this leucine-increased insulin secretion is blocked and is similar to the secretion levels from the control situation (5.6 mM of glucose). This latter result provides an insight that AGEs may be acting directly in the mitochondria, which is in agreement with a previous study supporting the idea that AGEs impair the secretion of pancreatic beta-cells at least in part through oxidative stress mechanisms [29]. Impaired mitochondrial function is also reported both *in vivo* and *in vitro* as a cause of insulin secretory dysfunction resulting from AGEs treatment [14, 15]. Another study has pointed out that the effects of AGEs, in a low concentration for longer exposure period, are mainly caused through a reduction in the expression of the malate dehydrogenase (*Mdh1/2*) gene, which plays an important role within the mitochondria [30]. Beyond the oxidative stress, AGEs are also formed in presence of hyperglycemia, but they still can be obtained from the diet [6–8, 31]. AGEs bind to their receptors for AGE (RAGE) resulting in a downstream signaling activation, generation of intracellular oxygen free radicals, and the activation of gene expression [22, 32] that could be involved in the inhibition of leucine-potentiated insulin release.

5. Conclusions

Altogether, we provide several evidences that AGEs might regulate the insulin secretion through specific and different pathways within the pancreatic islets, which remain to be revealed. Recent findings together with our data bring up the idea that AGEs can effectively inhibit or stimulate insulin secretion pathways. In addition to their chronically deleterious long-term effects in beta-cells, the AGEs acute effects described in the present work may participate in the onset of diabetes.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Ghada Elmhiri and Luiz Felipe Barella both have contributed equally to the paper.

Acknowledgment

This work was funded by the Institut Polytechnique LaSalle Beauvais.

References

- [1] G. Danaei, M. M. Finucane, Y. Lu et al., "National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants," *The Lancet*, vol. 378, no. 9785, pp. 31–40, 2011.
- [2] M. Brownlee, "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 813–820, 2001.
- [3] P. S. Sharp, S. Rainbow, and S. Mukherjee, "Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects," *Diabetic Medicine*, vol. 20, no. 7, pp. 575–579, 2003.
- [4] K. J. Wells-Knecht, D. V. Zyzak, J. E. Litchfield, S. R. Thorpe, and J. W. Baynes, "Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose," *Biochemistry*, vol. 34, no. 11, pp. 3702–3709, 1995.
- [5] P. J. Thornalley, "The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life," *Biochemical Journal*, vol. 269, no. 1, pp. 1–11, 1990.
- [6] A. Lapolla, D. Fedele, and P. Traldi, "Glyco-oxidation in diabetes and related diseases," *Clinica Chimica Acta*, vol. 357, no. 2, pp. 236–250, 2005.
- [7] H. Vlassara, "Advanced glycation in health and disease: role of the modern environment," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1043, pp. 452–460, 2005.
- [8] T. Goldberg, W. Cai, M. Peppia et al., "Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods," *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 104, no. 8, pp. 1287–1291, 2004.
- [9] J.-C. Henquin, "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose," *Diabetes*, vol. 49, no. 11, pp. 1751–1760, 2000.
- [10] P. Gilon and J.-C. Henquin, "Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic β -cell function," *Endocrine Reviews*, vol. 22, no. 5, pp. 565–604, 2001.
- [11] J. C. Henquin, "Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation," *Diabetologia*, vol. 52, no. 5, pp. 739–751, 2009.
- [12] M. S. Winzell and B. Ahrén, "G-protein-coupled receptors and islet function—implications for treatment of type 2 diabetes," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 116, no. 3, pp. 437–448, 2007.
- [13] Y. Zhu, T. Shu, Y. Lin et al., "Inhibition of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) protects pancreatic β -cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 404, no. 1, pp. 159–165, 2011.
- [14] Z. Zhao, C. Zhao, H. Z. Xu et al., "Advanced glycation end products inhibit glucose-stimulated insulin secretion through nitric oxide-dependent inhibition of cytochrome c oxidase and adenosine triphosphate synthesis," *Endocrinology*, vol. 150, no. 6, pp. 2569–2576, 2009.
- [15] M. T. Coughlan, F. Y. Yap, D. C. Tong et al., "Advanced glycation end products are direct modulators of β -cell function," *Diabetes*, vol. 60, no. 10, pp. 2523–2532, 2011.
- [16] C. Gravena, P. C. Mathias, and S. J. H. Ashcroft, "Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans," *Journal of Endocrinology*, vol. 173, no. 1, pp. 73–80, 2002.
- [17] F. Costal, E. Oliveira, A. Raposo et al., "Dual effect of advanced glycation end products in pancreatic islet apoptosis," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 29, no. 4, pp. 296–307, 2013.
- [18] J. C. de Oliveira, P. C. Lisboa, E. G. de Moura et al., "Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation," *Journal of Endocrinology*, vol. 216, no. 2, pp. 195–206, 2013.
- [19] F. Fiory, A. Lombardi, C. Miele, J. Giudicelli, F. Beguinot, and E. Van Obberghen, "Methylglyoxal impairs insulin signalling and insulin action on glucose-induced insulin secretion in the pancreatic beta cell line INS-1E," *Diabetologia*, vol. 54, no. 11, pp. 2941–2952, 2011.
- [20] L. Best, A. P. Yates, and S. Tomlinson, "Stimulation of insulin secretion by glucose in the absence of diminished potassium (86Rb+) permeability," *Biochemical Pharmacology*, vol. 43, no. 11, pp. 2483–2485, 1992.
- [21] Y. Sato and J.-C. Henquin, "The K⁺-ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism," *Diabetes*, vol. 47, no. 11, pp. 1713–1721, 1998.
- [22] A. Bierhaus, M. A. Hofmann, R. Ziegler, and P. P. Nawroth, "AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept," *Cardiovascular Research*, vol. 37, no. 3, pp. 586–600, 1998.
- [23] S. R. M. Madiraju and V. Poitout, "G protein-coupled receptors and insulin secretion: 119 and counting," *Endocrinology*, vol. 148, no. 6, pp. 2598–2600, 2007.
- [24] B. Ahrén, "Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 8, no. 5, pp. 369–385, 2009.
- [25] R. A. Ribeiro, S. L. Balbo, L. P. Roma et al., "Impaired muscarinic type 3 (M3) receptor/PKC and PKA pathways in islets from MSG-obese rats," *Molecular Biology Reports*, vol. 40, no. 7, pp. 4521–4528, 2013.
- [26] C. Li, H. Najafi, Y. Daikhin et al., "Regulation of leucine-stimulated insulin secretion and glutamine metabolism in isolated rat islets," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 5, pp. 2853–2858, 2003.
- [27] Z. Gao, R. A. Young, G. Li et al., "Distinguishing features of leucine and α -ketoisocaproate sensing in pancreatic β -cells," *Endocrinology*, vol. 144, no. 5, pp. 1949–1957, 2003.
- [28] A. Sener and W. J. Malaisse, "L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase," *Nature*, vol. 288, no. 5787, pp. 187–189, 1980.
- [29] N. Lin, H. Zhang, and Q. Su, "Advanced glycation end-products induce injury to pancreatic beta cells through oxidative stress," *Diabetes and Metabolism*, vol. 38, no. 3, pp. 250–257, 2012.
- [30] H. Hachiya, Y. Miura, K. Inoue, K. H. Park, M. Takeuchi, and K. Kubota, "Advanced glycation end products impair glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic β -cells," *Journal*

of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences, vol. 21, no. 2, pp. 134–141, 2014.

- [31] B. H. R. Wolffenbuttel, D. Giordano, H. W. Founds, and R. Bucala, “Long-term assessment of glucose control by haemoglobin-AGE measurement,” *The Lancet*, vol. 347, no. 9000, pp. 513–515, 1996.
- [32] S. D. Yan, D. Stern, and A. M. Schmidt, “What’s the RAGE? The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the dark side of glucose,” *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 27, no. 3, pp. 179–181, 1997.

V.3 Travaux complémentaires

V.3.1 Effets de l'exposition au MG de la mère sur la modulation de la sécrétion de l'insuline de la cellule pancréatique chez la descendance

a) Matériels et méthodes

L'expérimentation s'est déroulée à la station expérimentale de LaSalle Beauvais de Janvier 2015 à Juin 2015. L'isolement des îlots pancréatiques et le dosage de l'insuline ont été réalisés courant juin 2015.

i) *Modèle expérimental*

Des rats Wistar mâles et femelles âgés de 8 semaines ont subi dans un premier temps une acclimatation aux conditions de l'animalerie et au manipulateur pendant 4 jours puis une acclimatation au gavage. Les animaux ont été mis en accouplement (1 mâle pour 2 femelles). Un frotti vaginal a été effectué 2 fois par jour (matin / après-midi) afin de déterminer le début de la gestation (G0).

Neuf femelles gestantes ont été réparties en 3 groupes comme le montre le Tableau 9 et Figure 40:

1. Un groupe contrôle C (n= 5): les femelles reçoivent un régime contrôle et sont gavées quotidiennement à l'huile de maïs durant la période de gestation et de lactation.
2. Un groupe méthylglyoxal MG (n=5): les femelles reçoivent un régime contrôle et gavées quotidiennement avec le MG à une dose 12mg/Kg/ j (Poulsen et al, 2013) (dilué dans de l'huile de maïs) durant toute la période de gestation et de lactation.
3. Un groupe restriction alimentaire RA (n=5): es femelles reçoivent une restriction alimentaire énergétique de 50%. au cours de la gestation et de la lactation selon le protocole décrit par (Desai et al, 2005). A la naissance les portées ont été équilibrées à 8 petits /mère et les animaux ont été sevrés à l'âge de 21 jours.

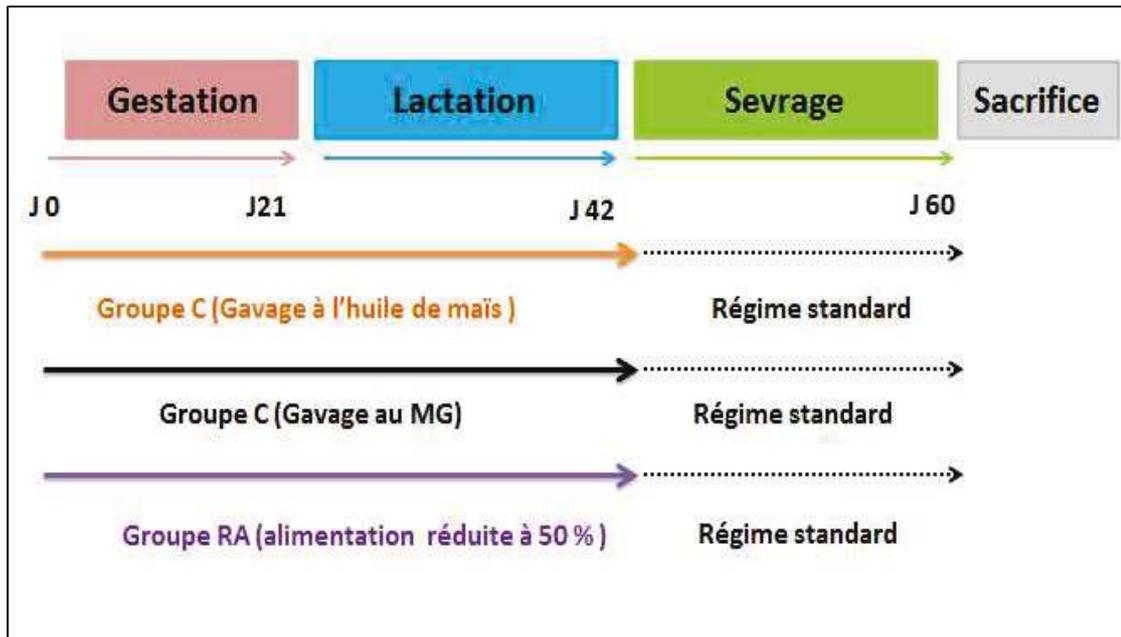


Figure 40 : Schéma du protocole expérimental

Tableau 9 : La répartition des groupes expérimentaux de l'étude

	GROUPE		DOSE/FIXE	QUANTITE - mg/kg/Jour - DANS CHAQUE DOSE
	Contrôle	Huile Maïs	200µL	X
	MG		200µL	12
	RESTRICTION (FR 50%) (RA)	Huile Maïs	200µL	X

Les animaux sont pesés tous les jours de leur naissance jusqu'au sevrage (J21). Après le sevrage, ils sont pesés 1 fois / semaine jusqu'au jour de l'euthanasie (J60).

ii) Test IPGTT (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test)

Ce test a pour but de déterminer la capacité des rats à normaliser la glycémie suite à une injection intrapéritonéale de glucose. Il reflète leur tolérance au glucose et met en jeu le processus de sécrétion d'insuline, et de la production hépatique de glucose, l'implication des tissus périphériques dans l'utilisation du glucose ainsi que la stimulation du système nerveux autonome. A J21, après une période de jeûne de 18 heures, les animaux reçoivent du glucose à raison de la dose de 1g/kg de poids vif. Afin de mesurer la tolérance au glucose, nous avons effectué des prélèvements sanguins au niveau de la queue à 0, 15, 30, 45, 60, 75, 95, 105 et 120 minutes. La glycémie (mg/ml) est mesurée par un glucomètre (Bayer Contour Glucomètre Xt Kit).

iii) Isolement des îlots pancréatiques

Nous avons effectué l'isolement des îlots pancréatiques selon les conditions décrites dans l'article 3 (Elmhiri et al, 2014).

iv) Dosage de l'insuline

Le dosage de l'insuline a été réalisé par ELISA (EIA, Bertin pharma ; Cayman chemical compagny) en appliquant les procédures proposées par le fournisseur

b) Résultats

Conformément à la littérature, la descendance du groupe RA se caractérise par un petit poids de naissance par comparaison aux groupes C (Figure 41). Les animaux C et MG suivent une courbe de croissance tout à fait normale alors que les animaux du groupe restreint accusent un retard de croissance très important principalement au cours de la lactation (Figure 42).

L'exposition des mères au MG a induit une baisse importante du niveau d'insuline sécrétée par les cellules pancréatiques isolées à partir de pancréas de rats adultes MG comparés au niveau mesuré sur les cellules issues de pancréas des rats C et RA (Figure 43) soit respectivement 10 et 8 fois moins. Le niveau d'insuline sécrété par les cellules du groupe RA est significativement plus élevé que celui mesuré à partir des cellules isolées du groupe C

et du groupe MG ($P < 0.001$). La baisse du niveau d'insuline dans le groupe MG montre que l'exposition maternelle au MG entraîne une défaillance de la sécrétion d'insuline par le pancréas de la descendance. Au vu des faibles doses utilisées, on pourrait suggérer que le MG, en traversant la barrière foeto-placentaire (Mericq et al, 2010), a agit comme une molécule « perturbateur endocrinien » et a inhibé le développement du pancréas (Organization, 2012). Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour explorer cette hypothèse.

Une baisse de la tolérance au glucose est observée chez la descendance comme l'atteste la mesure de l'aire sous la courbe de l'IPGTT, significativement ($P < 0.05$) plus faible chez les animaux MG comparée à celle des animaux C (Figure 44). Actuellement, en absence de la mesure de l'index HOMA (Homeostasis Model Assesment, indice) et d'autres paramètres métaboliques et biochimiques, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer ces résultats. Les travaux de Méricq et al, (2010) montrent une augmentation de l'index HOMA et de l'insuline chez des enfants de 12 mois dont les mères présentent un niveau plasmatique plus élevé de MG suggérant que le MG alimentaire est un bon marqueur du développement du diabète chez l'enfant de 12 mois. Cependant, aucune différence significative n'a été observée pour la CML.

En parallèle, nous avons aussi étudié *ex-vivo* les effets propres du MG sur les cellules β des animaux C et RA non exposés au cours de la gestation au MG. Les résultats de cette expérience montrent qu'en présence de MG, on a une baisse importante ($P < 0.001$) de la sécrétion d'insuline, par les cellules pancréatiques des rats C, (9 fois moins) par rapport aux animaux contrôles non stimulés. (Figure 45), contrairement au groupe RA, où on note une augmentation importante du taux de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques stimulées par le MG. ce qui atteste de la sensibilité de la cellule pancréatique de l'animal RA à l'effet du MG en conditions *ex vivo*.

c) Conclusion

L'ensemble des résultats sont très préliminaires mais méritent d'être confirmés. Ils montrent de manière globale que :

1. l'exposition maternelle à une faible dose de MG au cours de la gestation et de la lactation a induit une défaillance totale de la capacité de la cellule pancréatique à synthétiser l'insuline chez la descendance. Il serait judicieux de réaliser des tests supplémentaires pour caractériser cette situation physiopathologique.

-
2. lorsque les rats subissent un retard de croissance intra-utérin, ils deviennent extrêmement sensibles à l'exposition au MG *ex-vivo*. En effet, ils ne sont pas en mesure de synthétiser de l'insuline via le pancréas. Ceci montre des effets délétères directs du MG sur la fonctionnalité de la cellule β .

Des études complémentaires sont en cours au laboratoire pour compléter ces résultats et identifier le rôle du système oxydant dans ces processus.

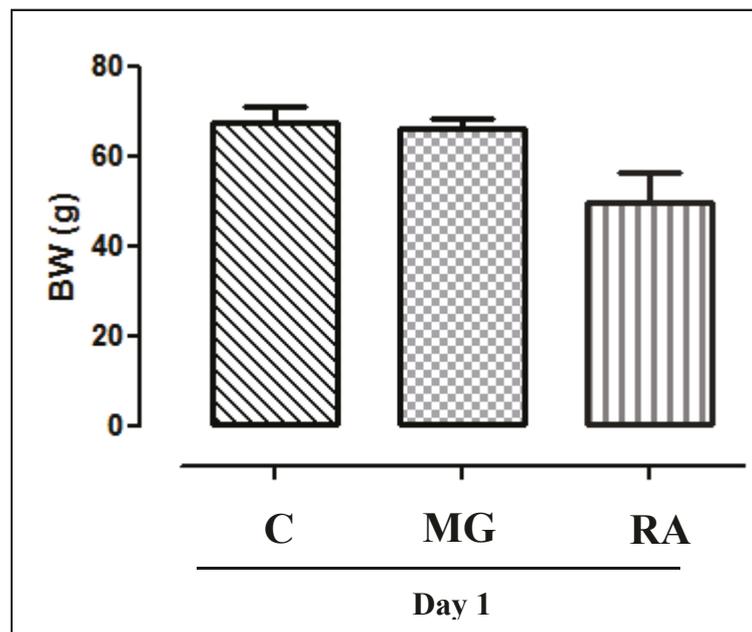


Figure 41 : Mesure du poids à la naissance de la descendance des groupes C, RA et MG. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; C (n= 8), RA (n=8) et MG (n=8). *: $P < 0.05$

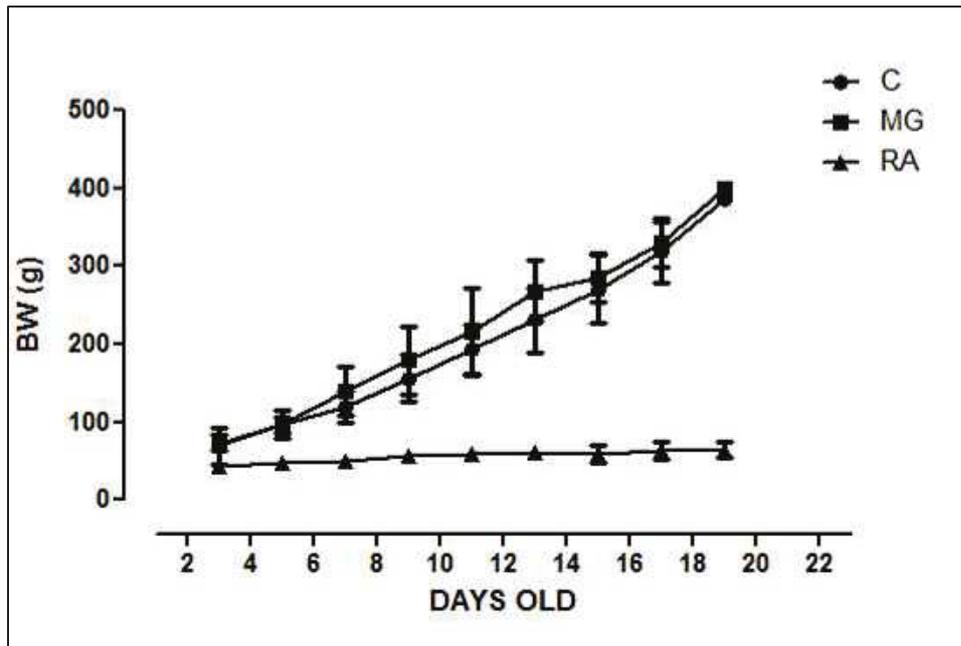


Figure 42 : Trajectoire de croissance de la descendance des groupes C, RA et MG. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; C (n= 8), RA (n=8) et MG (n=8).

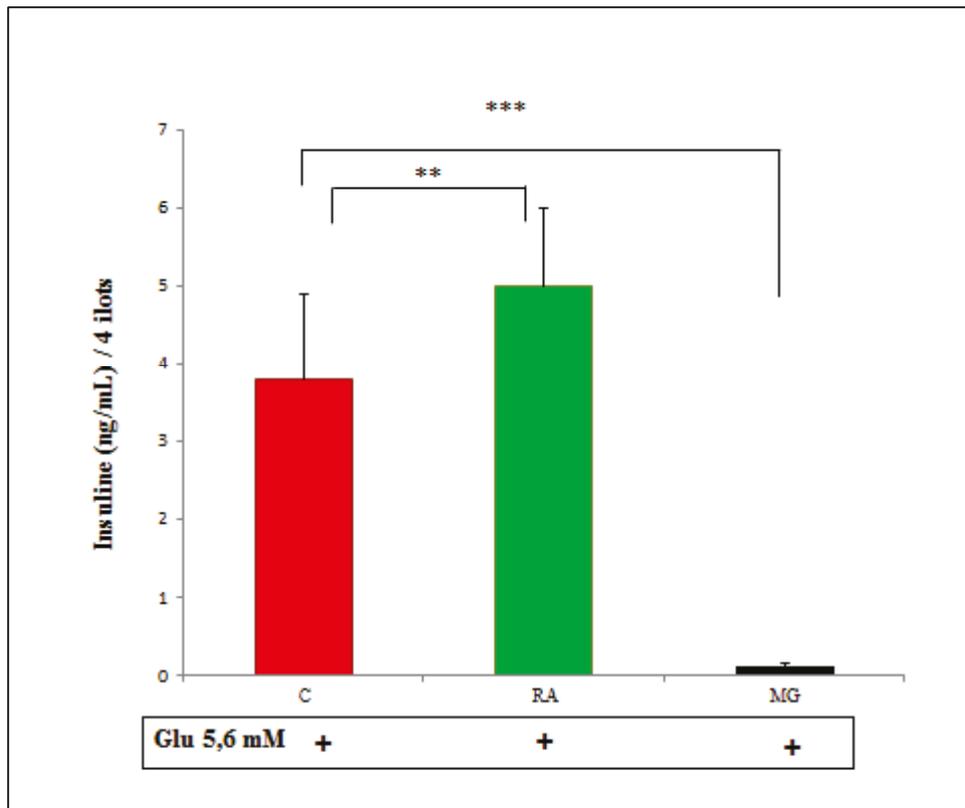


Figure 43 : Effets de l'exposition de la mère au MG sur la modulation de la sécrétion de l'insuline par le pancréas chez la descendance. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; C (n= 8), RA (n=8) et MG (n=8). **: $P < 0.001$ ***: $P < 0.0001$

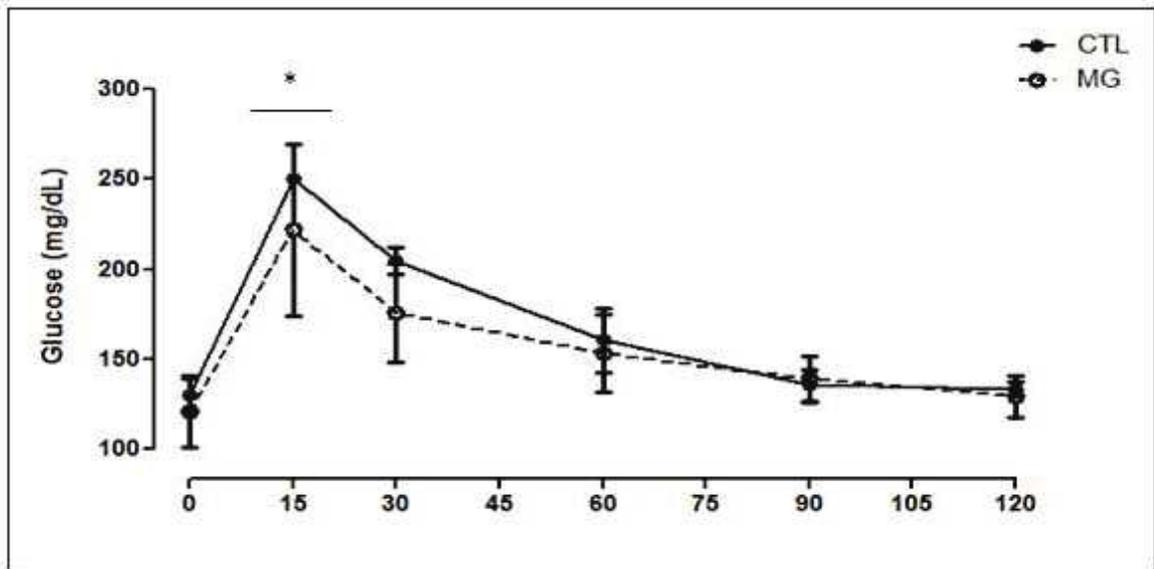


Figure 44 : Test IPGTT chez des animaux C et MG. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; C (n= 8) et MG (n=8).* P< 0.05

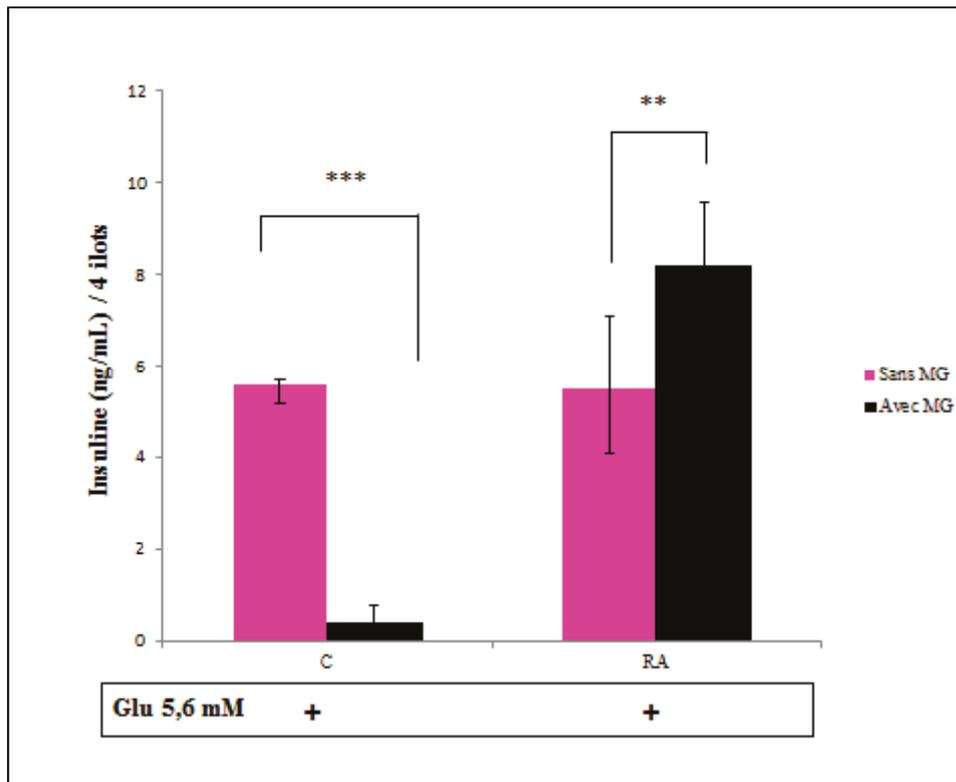


Figure 45 : Effet du MG sur la sécrétion de l'insuline par la cellule pancréatique (descendants des mères du groupe C et du groupe RA).Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ; C (n= 8), RA (n=8) et MG (n=8). **: P<0.001 ***: P<0.0001

PARTIE V: Discussion

En quoi la question sur la réaction de Maillard et la programmation est-elle pertinente?

Les femmes et les enfants sont constamment exposés, au travers de leur alimentation, à la présence des produits néoformés de la réaction de Maillard ou produits avancés de la glycation (AGEs) qui se forment au cours des traitements thermiques des aliments (Baumann et al, 2008; Poulsen et al, 2013). Aujourd'hui, même si un doute persiste sur la validité des bases de données publiées sur le contenu en AGEs de certains composés alimentaires, l'ensemble de la communauté scientifique est d'accord sur le fait que les enfants consommant les formules infantiles sont exposés à de fortes teneurs en AGEs au vu des quantités importantes de produits de glycation contenus dans ces aliments.

Il est bien connu, qu'au cours de la grossesse, l'alimentation de la mère impacte la santé du petit. Les travaux de Mericq et *al.*, (2010) ont montré que les produits de glycation franchissent la barrière foeto-placentaire et se retrouvent dans le cordon ombilical des petits dès la naissance. Des corrélations positives entre le niveau de certains composés de glycation ont été démontrées chez la mère, l'enfant de 6mois et d'un an. Ces corrélations ne présument en rien d'un effet de programmation mais suggèrent qu'au cours des périodes précoces de la vie, le fœtus/enfant est exposé aux composés néoformés à travers l'alimentation de sa mère (grossesse et allaitement) et de sa propre alimentation. Le niveau d'exposition est très variable selon les méthodes de préparation culinaire des aliments et des procédés de fabrication appliqués. Ainsi, suite à une exposition précoce aux AGES, le fœtus/enfant pourrait être prédisposé à un stress oxydant et déclencher un processus de "programmation" dont les conséquences sur sa santé à long terme ne seraient pas négligeables (Willcox et al, 2004).

Pourquoi existe-t-il peu d'études s'intéressant aux effets des AGEs alimentaires sur la programmation?

En France et dans le monde, la problématique de la programmation est toute récente. Il est aujourd'hui démontré, au travers d'études épidémiologiques, expérimentales et cliniques, que le développement des maladies métaboliques est lié aux perturbations de l'environnement précoce (péri et postnatal), mettant majoritairement en cause le déséquilibre de la balance énergétique (Mathias et al, 2014). Ce n'est que très récemment qu'une attention particulière a été portée sur les effets des contaminants alimentaires comme les perturbateurs endocriniens jamais mentionner les composés issus de la réaction de Maillard. L'académie de pharmacie a publié récemment (12 février 2014) un rapport dans lequel elle dénonce la «dangerosité» de

ces produits pour la santé et indique l'urgence des mesures à mettre en place pour limiter la présence des produits de glycation des protéines dans l'organisme. Ceci laisse entrevoir des perspectives d'étude à venir sur les effets à court, moyen et long terme sur la santé des populations.

Comment avons-nous abordé la question des AGEs alimentaires et la programmation?

Dans notre travail, nous avons développé différentes approches cellulaires et animales pour explorer les effets des AGEs alimentaires dans la mise en place et/ou l'aggravation des processus de programmation des pathologies chez l'adulte.

Nous nous sommes essentiellement placés dans le contexte de la physiopathologie du RCIU, au vu de la vulnérabilité de ces individus aux phénomènes de programmation développementale. Etant susceptibles à des dommages oxydatifs importants (Gupta et al, 2007) en plus de l'immaturation de certains de leurs organes (Wu et al, 2006), ces sujets sont prédisposés à être très sensibles aux agressions véhiculées par l'environnement, et en particulier par leur alimentation. Etant exclusivement alimenté par le lait (allaitement naturel ou formule) durant les premières semaines, voire les premiers mois de sa vie, le RCIU serait plus «sensible» à la présence des AGEs alimentaires que l'enfant né normal. De plus, les études relatives aux effets des AGEs alimentaires chez l'adulte sur le stress oxydant (Vaisse et al, 1996; Vlassara et al, 1985; Vlassara et al, 2002; Vlassara et al, 2009; Vlassara et al, 1992; Vlassara & Uribarri, 2014), la modulation du microbiote intestinal (Helou, 2014b), la dérégulation de la fonctionnalité de certains organes (Bohlender et al, 2005; Yang et al, 1991) et leur implication dans une pléthore de pathologies comme le diabète, les maladies cardiovasculaires (Birlouez-Aragon et al, 2010) et le vieillissement (Brownlee, 2001) appuient cette hypothèse.

Les acquis du laboratoire en termes d'étude sur la réaction de Maillard et son apport pour l'étude des effets des AGEs sur la programmation

Plusieurs travaux développés par Tessier (Loaec et al., 2014; Tessier, 2010; Tessier, 2012) ont permis de doser la CML dans plusieurs matrices alimentaires et échantillons biologiques. Ceci nous a permis d'adapter ces approches pour déterminer la teneur précise en CML des formules destinées aux porcs RCIU, les niveaux de CML libre et liée dans des échantillons plasmatiques, le niveau de CML totale dans les fèces, le rein et le tissu adipeux (les résultats du tissu adipeux n'ont pas pu être exploités faute de temps). Les données obtenues concordent dans l'ensemble avec la littérature sur d'autres modèles animaux (Alamir et al, 2013; Somoza

et al, 2006). Dans le rein, le dosage de la CML n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative de la teneur en CML chez les animaux RCIU nourris avec les laits LHF versus le groupe HHF. Cette absence de différence entre les deux groupes est probablement liée à notre méthode de prélèvement, certains compartiments pouvant contenir plus de CML que d'autres.

Par ailleurs, il est important de souligner que nous sommes les premiers à montrer que la consommation des formules hautement chauffées est associée à une forte présence des composés de glycation au niveau des noyaux des cellules épithéliales des tubules proximaux. Chez les animaux allaités, aucune présence de CML n'a été observée dans le noyau de ces cellules, démontrant le lien entre la consommation des formules chauffées et le passage de la CML alimentaire dans ce compartiment cellulaire. Ce résultat laisse supposer l'existence d'effets géniques et/ou épigénétiques au niveau rénal. Nous y reviendrons plus loin.

Il est bien admis que le rein est le siège principal d'élimination des produits de glycation (Bergmann & Johannsen, 2001; Sebekova et al, 2008). Plusieurs études ont montré que de fortes teneurs en AGEs sont retrouvées dans les urines des animaux nourris avec des régimes riches en AGEs (Alamir et al, 2013). La présence d'un marquage nucléaire au niveau des cellules rénales témoigne d'une faiblesse du système d'élimination de ces composés qui se retrouvent en excès au niveau plasmatique et dans le rein. Un mécanisme de translocation des AGEs (dont la nature reste inconnue) a été mis en place. Cette translocation est facilitée par l'augmentation de l'isoforme nucléaire du récepteur RAGE et la diminution de l'isoforme cytoplasmique. Parallèlement à ce mécanisme de translocation, une augmentation de la forme soluble du récepteur RAGE a été mise en évidence dans le plasma des animaux recevant le régime hautement chauffé, ce qui permettrait de faciliter la clairance de la CML et/ou des AGEs arrivant niveau du rein .

• Les acquis du laboratoire en termes d'étude sur le RCIU et leurs apports pour l'étude des effets des AGEs sur la programmation

Dans notre laboratoire, des études ont montré que chez le porc, le modèle naturel du RCIU est un modèle pertinent pour l'étude de la programmation développementale (Attig et al, 2013a; Attig et al, 2008a). Nous nous sommes donc intéressés à ce modèle pour tenter de comprendre les mécanismes physiologiques et moléculaires mis en place lors des processus de programmation par les AGEs alimentaires. Nous avons d'abord dosé la CML, principal marqueur des AGEs endogènes et exogènes, au cours du suivi des animaux. Nous avons montré que la CML passe dans le sang et que le niveau de la fraction libre est plus élevé chez les animaux ayant reçu le régime hautement chauffé par comparaison à celui des animaux

ayant reçu le régime faiblement chauffé. Il est important de rappeler que le niveau de la CML dans la formule lactée consommée par les porcelets RCIU est inférieure aux valeurs rapportées pour plusieurs formules infantiles commerciales (Delatour et al., 2009; Dittrich et al., 2006; Sebekova et al., 2008) mais est 670 fois plus élevée que la valeur de la CML dans le lait maternel (Birlouez-Aragon et al., 2010). Les travaux de Sebekova et al. (2008) ont montré que les enfants nourris au biberon présentent des concentrations de CML dans l'urine et dans le plasma respectivement 46 à 60 fois supérieures à celles retrouvées chez les nourrissons allaités. Lorsque les animaux ont consommé un régime solide, nous n'avons pas observé de différences significatives au niveau de la CML sérique entre les deux groupes d'animaux. Des observations similaires ont été faites par le groupe de Sebekova et al. (2001, 2002, 2008) qui a montré que l'introduction d'un régime mixte à haute teneur en CML est associée à une baisse de la CML plasmatique, suggérant que la diversification alimentaire impose une charge inférieure de CML par rapport à une consommation exclusivement lactée. Ces auteurs ont également montré qu'au moment de la diversification, le remplacement d'une formule à haut niveau de CML par une à faible niveau de CML n'est pas associé à une modification des teneurs en CML dans le plasma (Krajcovicova-Kudlackova et al, 2002; Sebekova et al, 2001; Sebekova et al, 2008). Que les enfants soient nourris au sein ou avec des formules, le niveau de CML est le même au moment de la diversification alimentaire. Ces résultats soulèvent quelques questions : 1) existe-t-il une régulation homéostatique des teneurs en CML en fonction de l'âge? 2) quelle est la cinétique de l'élimination de la CML après ingestion d'un régime riche en AGEs? Dans notre laboratoire, une cinétique de la CML a été menée sur des rongeurs adultes (Alamir et al., 2013; Somoza et al., 2006). Cette étude a montré l'existence d'un pic postprandial, 2 heures après le repas. La cinétique d'élimination n'a pas pu être déterminée de manière précise mais il semble que la CML totale soit éliminée après 4 heures. Il serait intéressant d'envisager des études de cinétique d'élimination de la CML en fonction de l'âge et de la teneur des formules en AGEs chez le porc qui présente de fortes homologues digestives et métaboliques avec l'Homme (Attig et al., 2013a; Attig et al., 2008a; Mostyn et al., 2014)).

Pourquoi des processus inflammatoires et oxydatifs à long terme sont-ils mis en place chez les animaux consommant le régime HHF?

Il est surprenant, qu'en dépit d'une absence de différence de niveau de CML à l'âge tardif, on ait pu mettre en évidence des effets de la consommation d'AGEs sur le stress oxydant et l'inflammation, et ce bien après la phase d'allaitement artificiel, Rappelons cependant qu'au moment de la phase lactée, les animaux du groupe HHF ont accusé une

baisse transitoire du poids et du gain de poids. Ces modifications corporelles pourraient être liées à la diminution de la biodisponibilité en lysine (Rerat et al, 2002), acide aminé indispensable à la croissance du porcelet. Par ailleurs, une augmentation du niveau de l'urée et du cholestérol a été montrée chez les animaux HHF. Nous pensons que ces modifications du niveau d'urée seraient liées au catabolisme important des acides aminés modifiés par le traitement thermique.

Les AGEs alimentaires sont connus pour induire des effets pro-oxydants et inflammatoires au niveau de plusieurs types cellulaires tels que les cellules immunitaires, le rein, les cellules pancréatiques et cardiaques (Cai et al., 2008; Hofmann et al., 2002). Un état de micro-inflammation au niveau du rein a été mis en évidence chez les porcelets nourris avec la formule contenant des hauts niveaux de CML. Cet état se manifeste par une surexpression de la protéine NF-kB et de sa forme activatrice p65. Il s'ensuit une surexpression de certaines cytokines pro-inflammatoires et apoptotiques (Cadet J, 2003). Ces résultats nous interpellent sur les éventuels effets inflammatoires des produits de la glycation dans les formules. La présence de certaines modifications histologiques au niveau du rein a été soulevée et l'on a notamment observé une diminution du diamètre des glomérules. De plus, des lésions de nature indéterminée au niveau des tubules rénaux ont été mises en évidence (résultats non présentés). Cependant, la rareté des lésions et le faible effectif ne permettent pas de tirer des conclusions sur la nature de ces observations histologiques.

Etant sujets à des dommages oxydatifs (Luo et al, 2006; Thompson & Al-Hasan, 2012), les animaux ayant consommé la formule riche en CML présentent une peroxydation lipidique dans le foie et une oxydation des protéines totales dans le foie et dans le rein. Cependant, il ne nous a pas été possible de mesurer les principaux marqueurs de l'oxydation ROS (Mahmood et al., 2013; Pisoschi AM, 2015). En revanche, des modifications post-traductionnelles de l'activité de certaines enzymes clés comme la SOD et la GPx ont été mises en évidence à l'âge juvénile. Nous nous sommes particulièrement concentrés sur les activités de ces deux enzymes car elles jouent un rôle actif dans l'élimination des radicaux libres d'oxygène. La SOD convertit les anions superoxydes en motifs moins réactifs, le peroxyde d'hydrogène, et offre une protection de la cellule contre les dommages oxydatifs. La GPx, quant à elle, catalyse la réduction des ions peroxydes et la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans la membrane cellulaire (Gupta et al., 2007). Dans notre étude, l'activité de la SOD est nettement augmentée avec la consommation de la formule riche en AGEs mais aucune différence de l'activité de la GPx n'est observée dans le foie des groupes d'animaux. Ces résultats indiquent une déficience du système antioxydant et de l'intégrité du système redox

dans le foie. En revanche, au niveau du rein, une situation inverse est observée, suggérant que le système de détoxification serait plus efficace au niveau de cet organe.

Nos résultats sont en accord avec d'autres études montrant les dommages oxydatifs et les changements importants dans les niveaux et l'activité de certaines enzymes antioxydantes, en réponse à l'exposition aux AGEs durant la période postnatale (Alamir et al., 2013; Bergmann & Johannsen, 2001; He, 1999; Tessier, 2010). Les résultats obtenus à long terme sont assez surprenants dans le sens où les effets précoces perdurent lors du développement des individus. Cette déplétion du métabolisme oxydatif, qui devrait normalement se renforcer avec l'âge, la croissance et la maturité des organes (Erbersdobler HF, 1987; Roncero-Ramos et al., 2013), témoigne incontestablement d'un phénomène de programmation. Certes, les effets sont observés à l'âge juvénile mais on peut penser que certaines marques épigénétiques auraient pu être établies, pouvant se manifester tardivement sous forme d'une dérégulation de la pression artérielle (Woods et al., 2001) ou d'une défaillance rénale. Des études à plus long terme méritent d'être poursuivies pour tester cette hypothèse.

Il va sans dire que la perturbation du statut redox et de la balance oxydant/antioxydant est un phénomène adaptatif mis en place par le RCIU pour contrecarrer l'altération de l'expression de gènes clés au niveau rénal et hépatique. Ce mécanisme adaptatif serait une des caractéristiques développées par le RCIU au cours de la période foetale lui permettant de faire face à des situations de stress déjà rencontrés in utero. Cette hypothèse rejoint celle du phénotype économe proposée par Neel en 1962.

Le système oxydant adaptatif est plus robuste au niveau colique du RCIU? Quel est le rôle du microbiote?

Il convient de rappeler que la majeure partie des connaissances sur le microbiote intestinal provient d'études menées chez des enfants nés avec un poids normal à la naissance. Les données sur le microbiote des enfants RCIU ou nés prématurés sont rares. Beaucoup de travaux se sont focalisés sur les différences qui existent entre le microbiote des enfants nourris au sein et ceux nourris au biberon. Elles convergent toutes vers une plus faible diversité microbienne au profit des enfants allaités (Bezirtzoglou et al., 2011), avec une plus grande proportion de Bifidobactéries et de Lactobacilles chez ces derniers (Weng & Walker, 2013). Cette abondance de bactéries lactiques et bifidogènes provient de la présence d'oligosaccharides au niveau du lait maternel. Le microbiote intestinal des enfants nourris aux formules est en revanche dominé par les Entérobactéries, Bactéroides, Clostridium et d'autres bactéries anaérobies, comme les streptocoques (Guaraldi & Salvatori, 2012). Les études sur le microbiote intestinal d'enfants nés avec un faible poids à la naissance (IUGR et prématurés)

sont très rares. Ces enfants semblent plus réceptifs à la supplémentation en pré et probiotiques que les enfants nés avec un poids normal (Fujji et al., 2006). En supplémentant les enfants avec des Bifidobactéries, les auteurs montrent que l'enfant prématuré double en moyenne la concentration plasmatique en TGF- β à l'âge de 28 jours, optimisant ainsi son développement. En revanche, une autre étude a montré que les enfants prématurés ne sont pas réceptifs à la supplémentation en oligosaccharides car, contre toute attente, celle-ci n'induit aucune augmentation de la flore bifidogène (Underwood et al., 2014). Ces études démontrent que la réactivité des enfants prématurés, face à la supplémentation, est très aléatoire et laissent penser qu'il est très difficile de manipuler de manière absolue la composition de leur microbiote (Groer et al., 2014).

S'agissant de l'impact du traitement thermique des formules sur le microbiote des enfants, il apparaît qu'aucune étude ne fait état de la question. Nos résultats montrent que la consommation du régime hautement chauffé entraîne une diminution significative de la diversité bactérienne dans le côlon lors de l'allaitement. De plus, cette baisse s'accompagne d'une augmentation des Lactobacilles et des Bifidobactéries. Il est donc très surprenant de constater que la formule traitée thermiquement apporte, au porc RCIU, un enrichissement de son environnement en bactéries probiotiques. Cette situation rappelle ce que l'on observe chez des enfants nourris avec le lait maternel (Gabory et al., 2009) (Bezirtzoglou et al., 2011) ou supplémentés avec des prébiotiques (Gibson & Roberfroid, 1995). Le profilage microbien obtenu lors de la consommation des formules hautement chauffées ne ressemble en rien à celui observé chez les enfants nourris classiquement avec les formules infantiles (Gibson & Roberfroid, 1995). Cette différence semble découler du double traitement thermique que les laits distribués ont subi (en usine avant la commercialisation puis au laboratoire à 120°C pendant 20 min avant la distribution aux animaux). Ce traitement apporte un enrichissement en bactéries probiotiques, bien connues pour potentialiser le développement du tube digestif chez l'enfant (pour revue voir Voreades et al., 2014)). Les flores lactique et bifide sont des flores qui favorisent la croissance et la santé des enfants (Wu et al., 2015). Chez le porc, la flore lactique est capable de produire des molécules antibactériennes pouvant changer le profil du microbiote. Testé sur des porcs de 6 à 10 semaines, l'apport de *Lactobacillus salivarius* UCC118 diminue la proportion relative des bactéries appartenant au phyla Spirochaetes (Riboulet-Bisson et al., 2012). Cependant la supplémentation en flore lactique ne permet pas souvent d'améliorer la croissance et la productivité des porcs, comme l'a souligné l'étude de Riboulet-Bisson et al. (2012).

Un autre résultat notable qui se dégage de notre étude est que l'environnement précoce apporté par le lait hautement chauffé induit un profilage microbien plus riche en Bacteroidetes à un âge plus tardif. Ce profilage est associé à une baisse significative du ratio Firmicutes/Bactéroidetes, ce qui présume d'un effet positif sur l'évolution du microbiote intestinal adulte. Nos résultats, sur le conditionnement du microbiote adulte par des événements environnementaux précoces, vont dans le même sens que ceux de Mulder et al. (2009). Ils ont en effet montré que le microbiote précoce peut conditionner le statut inflammatoire des animaux à long terme. Ainsi, un environnement hygiénique excessif durant la période néonatale modifie le profil bactérien intestinal en faveur d'un microbisme pro-inflammatoire plus tardivement. Ces études démontrent un lien étroit entre les bactéries acquises au cours des fenêtres de développement et la maturation du système immunitaire de l'hôte. L'existence de fenêtres développementales conditionnant le microbiote à l'âge adulte a également été révélé par les travaux de Cox et al. (2014) et d'Olszak et al. (2012) sur le modèle rongeur axénique.

Les modifications du microbiote colique chez le porcelet ayant consommé la formule hautement chauffée s'accompagnent d'une augmentation de l'activité enzymatique de la GPx et de l'expression de gènes clés du système oxydant/antioxydant. Cette observation atteste que le régime reçu au cours de la phase d'allaitement facilite la régulation du statut oxydant au niveau colique. L'abondance des Lactobacilles permettrait la mise en place d'un tel système au vu des corrélations positives trouvées entre l'activité GPx et le nombre de Lactobacilles présents dans le colon des animaux. De plus, aucune inflammation ni altération de l'épithélium colique n'ont été observées entre les animaux des deux groupes, suggérant que la consommation des deux formules serait sans effet nocif sur l'intégrité du colon.

• *Les AGEs sont-ils impliqués dans ce profilage microbien chez les porcs RCIU ?*

A l'exception des formules infantiles, il existe une littérature importante sur les effets des AGEs des matrices alimentaires, comme le café ou le pain, sur le microbiote. Citons par exemple les études récentes de Seiquer et al. (2014) qui comparent l'impact de régimes alimentaires plus ou moins riches en AGEs chez des adolescents et sur un modèle rongeur. Ces auteurs ont observé une corrélation négative entre la flore lactique et le taux des produits d'Amadori, de l'hydrométhylfurfural et de la CML présents dans les aliments, suggérant que le taux d'AGEs du régime alimentaire influencerait la composition du microbiote intestinal. Dans notre étude, la consommation de la formule riche en CML induit une augmentation de la flore Lactique, ce qui est en contradiction avec l'étude de Seiquer et al. (2014). Ces discordances pourraient provenir de l'âge des animaux et de la nature du microbiote intestinal

de chacune des espèces, le microbiote du rat étant très éloigné de celui du porc (Kim & Isaacson, 2015; Tomas et al., 2012).

Il est bien admis que la fraction non métabolisée ou «indigestible» des produits de la réaction de Maillard, appelée mélanoïdine, est connue pour ses effets prébiotiques et anti-oxydants (Tuohy et al., 2006). Les études sur l'impact des mélanoïdines du café en culture pure ont montré un effet antibactérien de ces composés (Tuohy et al., 2006). En système batch, ces composés sont fermentés par les microorganismes et jouent le rôle de fibres alimentaires favorisant l'installation des bactéries bénéfiques (Gniechwitz et al., 2008). En système batch, ces composés sont fermentés par les microorganismes et jouent le rôle de fibres alimentaires favorisant l'installation des bactéries bénéfiques (Gniechwitz et al., 2008). Dans l'unité EGAL, une étude récente sur l'impact des mélanoïdines du pain sur le microbiote a été conduite (Helou, 2014a). Les expérimentations sur le modèle rongeur n'ont pas permis de mettre en évidence les effets bifidogènes des mélanoïdines du pain (Helou et al., résultats non publiés) précédemment décrits dans la littérature (Borrelli & Fogliano, 2005b). Ces discordances semblent être liées aux différentes approches utilisées pour l'isolation de la fraction des mélanoïdines susceptibles de moduler le microbiote intestinal.

Il n'est donc pas exclu, au travers des acquis de la littérature, que la formule hautement chauffée puisse contenir des molécules (mélanoïdines, AGEs fermentés ou produits de fermentation des bactéries) pouvant moduler l'activité de certaines enzymes d'oxydation et aider le RCIU à mettre en place un système d'adaptation pour lutter contre la présence des produits indésirables de la réaction de Maillard. On peut s'attendre à ce que des modifications épigénétiques par le microbiote aient pu avoir lieu. En effet, du fait de la plasticité des organes après la naissance, certains composés issus de la fermentation bactérienne pourraient être à l'origine des modifications constatées sur le stress oxydant : tel est le cas du butyrate dont l'effet sur l'épigénome a été démontré (Mischke & Plosch, 2013). La cellule intestinale étant la première à être en contact avec les AGEs, on peut s'attendre à ce que des modifications épigénétiques touchent d'abord cette cellule, puis les cellules immunitaires et également d'autres cellules telles que les hépatocytes et les cellules rénales. Des mécanismes épigénétiques en rapport avec la modulation du microbiote intestinal par les AGEs des formules sont proposés dans la **Figure 46**. Des processus de méthylation de l'ADN ou des modifications des histones pourraient être impliqués dans cette programmation par les AGEs modifiés par le microbiote.

L'exposition maternelle aux AGEs induirait la programmation du diabète

Dans cette étude, nous avons choisi la voie de l'exposition orale des mères (rat wistar) pour évaluer les effets du MG sur la fonction pancréatique de la descendance. Ce mode d'exposition est celui qui reproduit le mieux les dangers de l'exposition alimentaire chez l'Homme. Les doses d'exposition sont faibles (Poulsen et al, 2013) pour écarter toute possibilité de toxicité majeure.

Bien que préliminaires, nos résultats indiquent que cette exposition perturbe la capacité de la cellule pancréatique à sécréter de l'insuline chez les rats «restreints». Nous observons également une baisse importante de la tolérance au glucose chez ces animaux. On pourrait s'attendre à ce que le MG induise une dérégulation du développement pancréatique dès la vie fœtale, avec par exemple la dérégulation de l'expression de gènes clés du développement pancréatique tels que PDX-1, Ccnd2 et p16. Chez la souris, il a été montré que la cellule pancréatique est très vulnérable à la toxicité induite par les AGEs (Cai et al, 2008; Hofmann et al, 2002). En outre, des études sur l'homme montrent que la résistance à l'insuline est en partie déterminée par l'environnement in utero (Dabelea et al., 1999; Leger et al., 1997; Leger et al., 1996). Ainsi, l'exposition à des niveaux élevés de MG au cours de la gestation pourrait être un événement décisif qui induirait une modification de la réponse immunitaire, passant d'une réponse innée vers une réponse pro-inflammatoire. Une fois installé, cet état d'inflammation est susceptible de provoquer des maladies comme le diabète et ce, dès le jeune âge (Dabelea et al, 2009).

Plusieurs travaux ont montré que le MG est impliqué dans le développement du diabète de type 2 et que ce précurseur des AGEs est connu pour avoir des effets toxiques sur le pancréas (Allaman et al., 2015). Les travaux de Vlassara et al. (2012) ont montré que l'ingestion chronique (sur 4 générations) d'un régime contenant du MG synthétique favorise l'installation du DT2. A la génération F3, les souris MG+ montrent une augmentation de l'adiposité et une expression précoce du récepteur à l'insuline dans le tissu adipeux. Cet état s'accompagne d'une déficience progressive du récepteur AGER1 et de SIRT1 dans le tissu adipeux blanc, le muscle squelettique et le foie. Une déficience du captage du glucose et de la voie IRS1 est observée chez les souris F3/MG+ alors que ces effets ne sont pas présents chez les souris F3/MG-. Sur une lignée d'adipocytes, les 3T3-L1, ces auteurs ont également montré que le MG induit la suppression de AGER1, SIRT1, IR, IRS1 et diminue la phosphorylation médiée par IRS2. De plus, une dérégulation de l'activité catalytique de la sous-unité p65 du facteur nucléaire NF- κ B est observée au niveau des cellules B, ce qui dénote une diminution du système de défense. Ainsi, l'exposition prolongée au MG semble induire une déplétion de AGER1 et de SIRT et une activation du stress oxydant et de l'inflammation dans plusieurs

types cellulaires. Ces mécanismes génèrent l'installation d'une insulino-résistance au fil des générations. Ces études trans-générationnelles reflètent des mécanismes épigénétiques à l'origine des modifications métaboliques.

Des études chez des diabétiques ont montré que la consommation de régimes pauvres en AGEs permettrait de restaurer ces facteurs et améliorerait le statut redox et inflammatoire, laissant ainsi entrevoir des implications cliniques importantes pour la lutte contre le diabète de type 2 (Uribarri et al, 2011). De même, chez des souris (NOD) présentant un diabète de type 1, la réduction des AGEs alimentaires diminue l'infiltration mononucléaire (Peppia et al, 2003).

Au vu du rôle important de SIRT et d'AGER1, il serait intéressant de vérifier si l'exposition maternelle au MG module l'expression de ces gènes. De même, compte tenu de la déplétion de la synthèse de l'insuline après exposition maternelle au MG, il serait intéressant de vérifier si l'exposition au MG induit une altération du système immunitaire chez le rat.

Contrairement aux animaux MG, les animaux, dont les mères ont subi une restriction alimentaire au cours de la gestation et de la lactation, montrent une grande sécrétion d'insuline, très supérieure à celle des animaux contrôles issus de mères ayant reçu le MG. Ces données révèlent une plus grande sensibilité de la cellule pancréatique des animaux restreints à la stimulation au glucose. Des résultats comparables ont été rapportés par (de Oliveira et al, 2013).

Dans notre étude, les mécanismes précis par lesquels le MG modifie la sécrétion insulinique des animaux restreints n'ont pas été étudiés. Le fait que le MG induise une déplétion de la synthèse d'insuline dans les îlots pancréatiques, démontre une grande sensibilité des îlots à l'agent toxique. L'activité anormale causée par le MG sur la cellule pancréatique pourrait représenter une contrainte «diabétogène» modifiant l'homéostasie du glucose.

Une réduction de la croissance du pancréas est souvent liée à la programmation du diabète de type 2 chez des animaux ayant subi une restriction de la croissance fœtale. Initialement, Hales et Barker ont proposé que la réduction de la croissance fœtale pourrait avoir des conséquences sur le développement de la cellule et sa capacité à sécréter l'insuline (Hales et al., 1991.). La restriction de la croissance fœtale in utero induit, dès le stade fœtal, une réduction du nombre de cellules pancréatiques ainsi qu'une diminution du nombre d'îlots et de la masse des cellules (Holemans et al., 1996; Garofano et al., 1997; Bertin et al., 1999). Ces changements résulteraient, chez le rat, d'une moindre prolifération des cellules, associée

ou non à une augmentation de l'apoptose au sein des îlots (Snoeck et al., 1990; Limesand et al., 2005; McMillen et al., 2005). Ces modifications structurales du pancréas endocrine se traduisent par des niveaux d'hormones circulantes plus bas (Holemans et al., 1996; Cherif et al., 1998) et par une moindre sécrétion d'insuline en réponse à une charge en glucose (Wilson et al., 1997).

PARTIE V: Conclusion Générale

La programmation du développement des maladies non transmissibles est désormais un paradigme établi. Les événements indésirables encourus au cours de la vie fœtale peuvent affecter le développement du fœtus et sa santé future. Ce risque de pathologies à l'âge adulte pourrait être majoré lorsqu'il est associé à un environnement postnatal délétère.

Dans notre travail, nous avons montré que les contaminants de la matrice alimentaire issus des traitements thermiques des formules pourraient représenter un risque de développement de pathologies rénales tardives chez le RCIU. Dans notre premier article, nous avons apporté les preuves que le rein est un lieu de stockage important de produits de glycation alimentaire et que leur arrivée au niveau sanguin est associée à une induction à long terme d'un état pro-inflammatoire et pro-apoptotique. Ceci s'accompagne de la modification de la régulation de l'expression de gènes clés de l'inflammation, du système rénine-angiotensine, de l'apoptose ainsi que des mécanismes de transport intracellulaire des AGEs par le récepteur RAGE. Ces observations révèlent que la surcharge des AGEs alimentaires issus de la consommation des formules de lait infantiles induit une augmentation des AGEs endogènes ; cet événement engendre l'installation d'un désordre métabolique et un amenuisement du système anti-oxydant au niveau du rein et du foie. Ainsi, nos études apportent la preuve que les AGEs alimentaires des formules infantiles jouent un rôle de modulateur du stress oxydant chez le jeune ; ce stress serait responsable des effets pro-apoptotiques et sans doute prolifératifs observés dans les travaux complémentaires réalisés *in vitro* sur des cellules embryonnaires rénales.

Il est aujourd'hui établi que l'amenuisement des défenses anti-oxydantes est une cause potentielle d'apparition de plusieurs pathologies. Notre travail a permis de montrer que l'exposition du RCIU aux AGEs le programme, à terme, au stress oxydant. Actuellement, il existe un réel consensus scientifique sur le fait que, plus un individu est dépourvu d'antioxydants, plus il a des risques de développer des pathologies chroniques. Nos travaux non seulement confirment ce constat mais apportent en plus une explication d'une des manifestations de cette relation en montrant que la présence des AGEs réduit fortement les

antioxydants et altère la fonction de plusieurs organes. Récemment, des avancées spectaculaires ont été réalisées dans la compréhension de l'implication du stress oxydant dans le développement du diabète. Ceci amène à penser, qu'au cours de la gestation, le MG pourrait également être impliqué dans les processus du stress oxydant induisant le diabète.

Le colon est un organe complexe qui héberge des populations bactériennes importantes dont le rôle sur la santé de l'hôte a largement été étudié. Contrairement aux autres organes comme le foie et le rein, la présence des bactéries coliques contribue à la protection de l'hôte des effets oxydants induits par les AGEs. Ces résultats nous interpellent sur la complexité des effets des composés néoformés de la réaction de Maillard et en particulier des effets tissus spécifiques de certains d'entre eux sur l'organisme.

Selon l'organe ciblé, certains composés auraient des effets bénéfiques alors que d'autres présenteraient des effets délétères. Au vu des résultats sur le colon, l'identification des composés bénéfiques et leur isolation à partir des formules infantiles est une piste à considérer dans le développement de stratégies nutritionnelles anti-oxydantes (en supplémentation alimentaire) ; ces dernières protégeraient aussi l'enfant des effets toxiques de contaminants issus soit des produits de glycation, soit de la matrice alimentaire.

Aujourd'hui, bien des sociétés savantes comme la SF-DOHAD nous interpellent sur les risques encourus dans le développement des maladies du jeune enfant par l'exposition précoce aux contaminants environnementaux. L'ensemble des travaux rapportés fournit des données nouvelles concernant le rôle des produits de glycation des aliments dans la programmation du stress oxydant chez le RCIU et les implications à long terme de ce stress sur sa santé. Il se dégage aussi de nouvelles pistes de recherche sur l'implication du méthylglyoxal, un précurseur des AGEs, dans la programmation du diabète. Des pistes nouvelles sur les effets bénéfiques de certains composés et/ou produits de fermentation des bactéries au contact des AGEs du lait, sont rapportées et montrent le rôle du microbiote intestinal dans la défense de l'organisme.

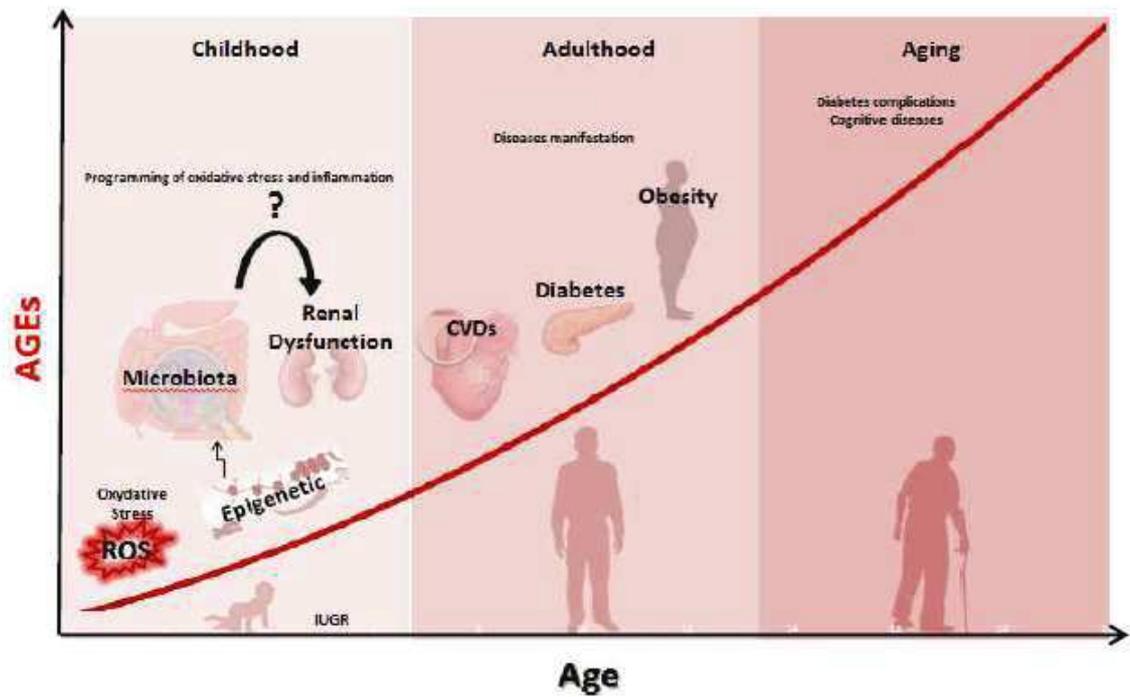


Figure 46 : Schéma récapitulatif de l'effet des AGEs issus des formules sur les modifications du microbiote intestinal et la programmation du stress oxydant chez l'adulte.

PARTIEVI: Références bibliographiques

Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW (1986) Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem***261**: 4889-4894

Ahmed N, Mirshekar-Syahkal B, Kennish L, Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Thornalley PJ (2005) Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Mol Nutr Food Res***49**: 691-699

Alamir I, Niquet-Leridon C, Jacolot P, Rodriguez C, Orosco M, Anton PM, Tessier FJ (2013) Digestibility of extruded proteins and metabolic transit of N epsilon -carboxymethyllysine in rats. *Amino Acids***44**: 1441-1449

Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A (2010) Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental health perspectives***118**: 1243-1250

Ames J, & Wynne, A. (1999) The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. . *British Journal of* **82(6)**: 489–495.

Arisawa K, Takeda H, Mikasa H (2005) Background exposure to PCDDs/PCDFs/PCBs and its potential health effects: a review of epidemiologic studies. *The journal of medical investigation* : *JMI***52**: 10-21

ARSAN A. VG, DARTOIS A.M., DU FRAYSSEIX M. (2011) Alimentation de l'enfant de la naissance à 3 ans. **5ème édition. Paris : Editions Doin, : 222**

Attig L, Brisard D, Larcher T, Mickiewicz M, Guilloteau P, Boukthir S, Niamba CN, Gertler A, Djiane J, Monniaux D, Abdennebi-Najar L (2013a) Postnatal Leptin Promotes Organ Maturation and Development in IUGR Piglets. *PLoS One***8**: e64616

Attig L, Djiane J, Gertler A, Rampin O, Larcher T, Boukthir S, Anton PM, Madec JY, Gourdou I, Abdennebi-Najar L (2008) Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-weight piglets and effects of leptin supplementation on neonatal growth and development. *Am J Physiol Endocrinol Metab***295**: E1117-1125

Attig L, Vige A, Gabory A, Karimi M, Beauger A, Gross MS, Athias A, Gallou-Kabani C, Gambert P, Ekstrom TJ, Jais JP, Junien C (2013b) Dietary alleviation of maternal obesity and diabetes: increased resistance to diet-induced obesity transcriptional and epigenetic signatures. *PLoS One***8**: e66816

B. AJL (1987) Le lactose. In: CEPIL. Le lait matière première de l'industrie alimentaire. *INRA*, : p. 99-111.

Baillie-Hamilton PF (2002) Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *Journal of alternative and complementary medicine (New York, NY)***8**: 185-192

Barker DJ (1990) The fetal and infant origins of adult disease. *Bmj***301**: 1111

Barker DJ (2004) The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition***23**: 588S-595S

Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME (1989) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Bmj***298**: 564-567

Barr DB, Bishop A, Needham LL (2007) Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reprod Toxicol***23**: 260-266

Bauer R, Walter B, Bauer K, Klupsch R, Patt S, Zwiener U (2002) Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets. *Acta physiologica Scandinavica***176**: 83-90

Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, Bucala R, Vlassara H (1995) Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes***44**: 824-829

Bell DS (2003) Heart failure: the frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. *Diabetes Care***26**: 2433-2441

Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR (1993) Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet***341**: 339-341

Berg TJ, Clausen JT, Torjesen PA, Dahl-Jorgensen K, Bangstad HJ, Hanssen KF (1998) The advanced glycation end product Nepsilon-(carboxymethyl)lysine is increased in serum from children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes care***21**: 1997-2002

Bergmann R, Helling, R., Heichert, C., Scheunemann, M., Mading, P., Witttrisch, H., Johannsen B, Henle, T., . (2001) Radio fluorination and positron emission tomography (PET) as a new approach to study the in vivo distribution and elimination of the advanced glycation endproducts N-epsilon-carboxymethyllysine (CML) and N-epsilon-carboxyethyllysine (CEL). *. Nahrung*

Beringue F, Blondeau B, Castellotti MC, Breant B, Czernichow P, Polak M (2002) Endocrine pancreas development in growth-retarded human fetuses. *Diabetes***51**: 385-391

Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW (2011) Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Anaerobe***17**: 478-482

Bloomfield FH, Jaquiere AL, Oliver MH (2013) Nutritional regulation of fetal growth. *Nestle Nutrition Institute workshop series***74**: 79-89

Borrelli RC, Fogliano V (2005a) Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol Nutr Food Res***49**: 673-678

Borrelli RC, Fogliano V (2005b) Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol Nutr Food Res***49**: 673-678

Boulanger E, Dequiedt P, Wautier JL (2002) [Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins?]. *Nephrologie***23**: 351-359

Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature***414**: 813-820

Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H (1994) Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A***91**: 9441-9445

Bucala R, Vlassara H (1995) Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis***26**: 875-888

Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA (2007) Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr***97**: 1036-1046

Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, Going TC, Bailey RA (1997) Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest***100**: 1768-1774

Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Zheng F, Striker GE, Vlassara H (2008) Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *Am J Pathol***173**: 327-336

Casals-Casas C, Feige JN, Desvergne B (2008) Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. *International journal of obesity (2005)***32 Suppl 6**: S53-61

Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A (1997) Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A***94**: 13915-13920

Cherif H, Reusens B, Ahn MT, Hoet JJ, Remacle C (1998) Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. *J Endocrinol***159**: 341-348

Chomtho S, Wells JC, Williams JE, Lucas A, Fewtrell MS (2008) Associations between birth weight and later body composition: evidence from the 4-component model. *The American journal of clinical nutrition***88**: 1040-1048

Chuyen NV (2006) Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Mol Nutr Food Res***50**: 1140-1149

Cianfarani S, Germani D, Branca F (1999) Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition***81**: F71-73

Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, Kim SG, Li H, Gao Z, Mahana D, Zarate Rodriguez JG, Rogers AB, Robine N, Loke P, Blaser MJ (2014) Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell***158**: 705-721

Crace CJ, Swenne I, Milner RD (1991) Long-term effects on glucose tolerance and insulin secretory response to glucose following a limited period of severe protein or energy malnutrition in young rats. *Upsala journal of medical sciences***96**: 177-183

Cryer PE (2001) Hypoglycemia risk reduction in type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes***109 Suppl 2**: S412-423

D'Inca R, Kloareg M, Gras-Le Guen C, Le Huerou-Luron I (2010) Intrauterine growth restriction modifies the developmental pattern of intestinal structure, transcriptomic profile, and bacterial colonization in neonatal pigs. *J Nutr***140**: 925-931

Dabelea D, Pettitt DJ, Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC (1999) Birth weight, type 2 diabetes, and insulin resistance in Pima Indian children and young adults. *Diabetes care***22**: 944-950

Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C, Gazzani G (2002) Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem***50**: 1225-1229

de Onis M, Blossner M, Villar J (1998) Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. *European journal of clinical nutrition***52 Suppl 1**: S5-15

Delatour T, Hegele J, Parisod V, Richoz J, Maurer S, Steven M, Buetler T (2009) Analysis of advanced glycation endproducts in dairy products by isotope dilution liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. The particular case of carboxymethyllysine. *J Chromatogr A***1216**: 2371-2381

Delgado-Andrade C, Tessier FJ, Niquet-Leridon C, Seiquer I, Pilar Navarro M (2012) Study of the urinary and faecal excretion of Nepsilon-carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids***43**: 595-602

Desai M, Byrne CD, Zhang J, Petry CJ, Lucas A, Hales CN (1997) Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet. *Am J Physiol***272**: G1083-1090

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG (2005) Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol***288**: R91-96

Edwards LJ, McMillen IC (2001) Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation. *J Physiol***533**: 561-570

El-Khattabi I, Gregoire F, Remacle C, Reusens B (2003) Isocaloric maternal low-protein diet alters IGF-I, IGFBPs, and hepatocyte proliferation in the fetal rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab***285**: E991-E1000

Elmhiri G, Mahmood DF, Niquet-Leridon C, Jacolot P, Firmin S, Guigand L, Tessier FJ, Larcher T, Abdennebi-Najar L (2015) Formula-derived advanced glycation end products are involved in the development of long-term inflammation and oxidative stress in kidney of IUGR piglets. *Mol Nutr Food Res***59**: 939-947

Erbersdobler HF DB, Nangpal A, Reuter H (1987) Determination of furosine in heated milk as a measure of heat intensity during

processing. . *J Dairy Res* **54**:: 147–151

Eriksson J, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker D (2000) Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension***36**: 790-794

Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ (1999) Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *Bmj***318**: 427-431

FAO. (consulté le 2 novembre 2013) Food and Agriculture Organization, département de l'agriculture. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. . [en ligne] <http://www.fao.org/docrep/t4280f/t4280f04.htm>

Finot PA, Magnenat, E. (1981) Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog Food Nutr Sci* **5**, **Sci. 5**: 193–207.

Fleischer Michaelsen K, Weaver L, Francesco B, Aileen R (2000

) Feeding and nutrition of infants and young children. *WHO regional publications European series***87**

Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Mogensen TH, Paludan SR, Rasch R (2004) Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes***53**: 166-172

Forbes JM, Soulis T, Thallas V, Panagiotopoulos S, Long DM, Vasan S, Wagle D, Jerums G, Cooper ME (2001) Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetologia***44**: 108-114

Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D (2000) The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Annals of internal medicine***133**: 176-182

Fowden AL (2003) The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta***24**: 803-812

Fowden AL, Forhead AJ (2004) Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction (Cambridge, England)***127**: 515-526

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ (2006) Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda, Md)***21**: 29-37

Friedman EA (1999) Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care***22 Suppl 2**: B65-71

Friedman MM (1996) Problematic standards: staff rights and nutritional assessments. *Home healthcare nurse***14**: 108-110

Friis H, Gomo E, Nyazema N, Ndhlovu P, Krarup H, Kaestel P, Michaelsen KF (2004) Effect of multimicronutrient supplementation on gestational length and birth size: a randomized, placebo-controlled, double-blind effectiveness trial in Zimbabwe. *The American journal of clinical nutrition***80**: 178-184

Gabory A, Attig L, Junien C (2009) Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol Cell Endocrinol***304**: 8-18

Garofano A, Czernichow P, Breant B (1997) In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia***40**: 1231-1234

Gatford KL, Wintour EM, De Blasio MJ, Owens JA, Dodic M (2000) Differential timing for programming of glucose homeostasis, sensitivity to insulin and blood pressure by in utero exposure to dexamethasone in sheep. *Clin Sci (Lond)***98**: 553-560

Gauster M, Hiden U, Blaschitz A, Frank S, Lang U, Alvino G, Cetin I, Desoye G, Wadsack C (2007) Dysregulation of placental endothelial lipase and lipoprotein lipase in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab***92**: 2256-2263

Gennser G, Rymark P, Isberg PE (1988) Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *British medical journal (Clinical research ed)***296**: 1498-1500

Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr***125**: 1401-1412

Gniechwitz D, Reichardt N, Meiss E, Ralph J, Steinhart H, Blaut M, Bunzel M (2008) Characterization and fermentability of an ethanol soluble high molecular weight coffee fraction. *J Agric Food Chem***56**: 5960-5969

Godfrey K, Robinson S, Barker DJ, Osmond C, Cox V (1996) Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *Bmj***312**: 410-414

Goldenberg RL, Culhane JF, Johnson DC (2005) Maternal infection and adverse fetal and neonatal outcomes. *Clinics in perinatology***32**: 523-559

Groer MW, Luciano AA, Dishaw LJ, Ashmeade TL, Miller E, Gilbert JA (2014) Development of the preterm infant gut microbiome: a research priority. *Microbiome***2**: 38

Guaraldi F, Salvatori G (2012) Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Frontiers in cellular and infection microbiology***2**: 94

Gugliucci A, Bendayan M (1996) Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia***39**: 149-160

Gupta P, Ray M, Dua T, Radhakrishnan G, Kumar R, Sachdev HP (2007) Multimicronutrient supplementation for undernourished pregnant women and the birth size of their offspring: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Archives of pediatrics & adolescent medicine***161**: 58-64

Hales CN, Barker DJ (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia***35**: 595-601

Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED (1999) Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia***42**: 728-736

Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, Lu Y, Rosario RH, Oruganti S, Nikolla Z, Belov D, Lalla E, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2008) Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest***118**: 183-194

Hasenkopf K, Ubel B, Bordiehn T, Pischetsrieder M (2001) Determination of the Maillard product oxalic acidmonolysinylamide (OMA) in heated milk products by ELISA. *Nahrung***45**: 206-209

He C, Sabol J., Mitsuhashi, T., Vlassara, H. (1999) Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes* **48**: 1308–1315

Hendrix N, Berghella V (2008) Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Seminars in perinatology***32**: 161-165

Henle T (2003a) AGEs in foods: do they play a role in uremia? *Kidney Int Suppl*: S145-147

Henle T, Miyata, T., 2003. . (2003b) Advanced glycation end products in uremia. *Adv Ren Repl Ther* **10**, : 321–331

Henle T SU, Klostermeyer H (1997) Detection and quantification of pentosidine in foods. . *Z Lebensm Unters Forsch A*

204:: 95-98

Herpin P, J. LD (1998) Conséquences de l'augmentation de la prolificité des truies sur la survie et la croissance du porcelet. *INRA Productions Animales*: 253-255

Hodge JE (1953) Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem***1(15)**: 928–943 doi:910.1021/jf60015a60004

Hoegerman G, Wilson CA, Thurmond E, Schnoll SH (1990) Drug-exposed neonates. *The Western journal of medicine***152**: 559-564

Hofmann SM, Dong HJ, Li Z, Cai W, Altomonte J, Thung SN, Zeng F, Fisher EA, Vlassara H (2002) Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes***51**: 2082-2089

Hofmann T, Bors W, Stettmaier K (1999) Radical-assisted melanoidin formation during thermal processing of foods as well as under physiological conditions. *J Agric Food Chem***47**: 391-396

Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL (1995) Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatric research***38**: 267-271

Holemans K, Verhaeghe J, Dequeker J, Van Assche FA (1996) Insulin sensitivity in adult female rats subjected to malnutrition during the perinatal period. *J Soc Gynecol Investig***3**: 71-77

Hull GLJ, Woodside, J. V., Ames, J. M., & Cuskelly, G. J. (2012) Nε-(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chemistry* **131(1)**: 170–174

Ibanez L, Valls C, Ong K, Dunger DB, de Zegher F (2006) Metformin therapy during puberty delays menarche, prolongs pubertal growth, and augments adult height: a randomized study in low-birth-weight girls with early-normal onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab***91**: 2068-2073

Isabelle. M-G (2001) Critères de choix concernant l'alimentation du nouveau-né: A ce propos, enquête prospective de 308 femmes menée en ville. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine Université d'Angers*: 151p

ISPED. (consulté le 2 octobre 2013) Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement. La composition des différents laits de mammifères, boissons végétales et préparations pour nourrissons, [en ligne], . http://symptomes-solutions-allergiescom/wp-content/uploads/grpe_0-3ans_diapo_rama_compo_lait_mammifpdf

Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet***33 Suppl**: 245-254

Jansson T, Lambert GW (1999) Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3-4 months of age. *Journal of hypertension***17**: 1239-1248

Jansson T, Powell TL (2007) Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)***113**: 1-13

Jaquet D, Gaboriau A, Czernichow P, Levy-Marchal C (2000) Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab***85**: 1401-1406

Jarvenpaa J, Vuoristo JT, Savolainen ER, Ukkola O, Vaskivuo T, Ryyanen M (2007) Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol***23**: 351-355

Karlberg J, Albertsson-Wikland K (1995) Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatric research***38**: 733-739

Kay HH, Grindle KM, Magness RR (2000) Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am J Obstet Gynecol***182**: 682-688

KCM Frank Kneepkens LP, P Brand (5 Feb 2010) Breastfeeding and the prevention of allergy. *Eur J pediatr*

Khan NA, Kazzi SN (2000) Yield and costs of screening growth-retarded infants for torch infections. *Am J Perinatol***17**: 131-135

Kim HB, Isaacson RE (2015) The pig gut microbial diversity: Understanding the pig gut microbial ecology through the next generation high throughput sequencing. *Veterinary microbiology***177**: 242-251

Kind KL, Clifton PM, Grant PA, Owens PC, Sohlstrom A, Roberts CT, Robinson JS, Owens JA (2003) Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol***284**: R140-152

Kind KL, Roberts CT, Sohlstrom AI, Katsman A, Clifton PM, Robinson JS, Owens JA (2005) Chronic maternal feed restriction impairs growth but increases adiposity of the fetal guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol***288**: R119-126

Kind KL, Simonetta G, Clifton PM, Robinson JS, Owens JA (2002) Effect of maternal feed restriction on blood pressure in the adult guinea pig. *Experimental physiology***87**: 469-477

King GL, Shiba T, Oliver J, Inoguchi T, Bursell SE (1994) Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annu Rev Med***45**: 179-188

Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P (2000) Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology***92**: 35-43

Klenovics KS, Boor P, Somoza V, Celec P, Fogliano V, Sebekova K (2013) Advanced glycation end products in infant formulas do not contribute to insulin resistance associated with their consumption. *PLoS One***8**: e53056

Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H (1997) Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A***94**: 6474-6479

Langley-Evans SC (1997) Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *Journal of hypertension***15**: 537-544

Langley-Evans SC, Nwagwu M (1998) Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life sciences***63**: 605-615

Langley SC, Browne RF, Jackson AA (1994a) Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comparative biochemistry and physiology***109**: 223-229

Langley SC, Seakins M, Grimble RF, Jackson AA (1994b) The acute phase response of adult rats is altered by in utero exposure to maternal low protein diets. *J Nutr***124**: 1588-1596

Lapolla A, Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, Baccarin L, Laverda B, Fedele D (2007) Advanced glycation end products and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral artery disease. *Diabetes Care***30**: 670-676

Lebeuf Y. MJ-C, Moineau S. (2002) Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *Science et technologie du lait*

Lee EJ, Park EY, Mun H, Chang E, Ko JY, Kim do Y, Park JH (2015) Soluble receptor for advanced glycation end products inhibits disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease by down-regulating cell proliferation. *Faseb j***29**: 3506-3514

Leger J, Levy-Marchal C, Bloch J, Pinet A, Chevenne D, Porquet D, Collin D, Czernichow P (1997) Reduced final height and indications for insulin resistance in 20 year olds born small for gestational age: regional cohort study. *Bmj***315**: 341-347

Leger J, Noel M, Limal JM, Czernichow P (1996) Growth factors and intrauterine growth retardation. II. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein 3 levels in children with intrauterine growth retardation compared with normal control subjects: prospective study from birth to two years of age. Study Group of IUGR. *Pediatric research***40**: 101-107

Leon DA, Johansson M, Rasmussen F (2000) Gestational age and growth rate of fetal mass are inversely associated with systolic blood pressure in young adults: an epidemiologic study of 165,136 Swedish men aged 18 years. *American journal of epidemiology***152**: 597-604

Limesand SW, Jensen J, Hutton JC, Hay WW, Jr. (2005) Diminished beta-cell replication contributes to reduced beta-cell mass in fetal sheep with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol***288**: R1297-1305

Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR (1996) Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia***39**: 1299-1305

Lipkind HS, Curry AE, Huynh M, Thorpe LE, Matte T (2010) Birth outcomes among offspring of women exposed to the September 11, 2001, terrorist attacks. *Obstetrics and gynecology***116**: 917-925

Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, Lithell UB, Leon DA (1996) Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *Bmj***312**: 406-410

Lucas A (1991) Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation symposium***156**: 38-50; discussion 50-35

Lucas A (1998) Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr***128**: 401S-406S

Lumey LH (1992) Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944-1945. *Paediatric and perinatal epidemiology***6**: 240-253

Maessen DE, Stehouwer CD, Schalkwijk CG (2015) The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond)***128**: 839-861

MAHAUT Michel JR, BRULE Gérard, SCHUCK Pierre. : (2000) Les produits industriels laitiers. . *Paris Editions TEC and Doc* , : p 178

Maillard LC (1912) Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. . *Compte- Rendu de l'Académie Des Sciences***154**: 66–68.

Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I (2000) Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney international***58**: 770-773

Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, Chervenak FA, Figueras F, Grunebaum A, Puerto B, Skupski D, Stanojevic M (2008) Intrauterine restriction (IUGR). *Journal of perinatal medicine***36**: 277-281

Martins SIFS, & van Boekel, M. a. J. S. (2003) Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. *Food Chemistry***83(1)**: 135–142

Mauron J (1990) Influence of processing on protein quality. *Journal of nutritional science and vitaminology***36 Suppl 1**: S57-69

McMillen IC, Robinson JS (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological reviews***85**: 571-633

Mericq V, Piccardo C, Cai W, Chen X, Zhu L, Striker GE, Vlassara H, Uribarri J (2010) Maternally transmitted and food-derived glycotoxins: a factor preconditioning the young to diabetes? *Diabetes care***33**: 2232-2237

Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B (1994) Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)***8**: 175-180

Mickiewicz M, Zabielski R, Grenier B, Le Normand L, Savary G, Holst JJ, Oswald IP, Metges CC, Guilloteau P (2012) Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. *J Physiol Pharmacol***63**: 225-239

Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K (1998) Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int***53**: 416-422

Monteiro PO, Victora CG (2005) Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. *Obes Rev***6**: 143-154

Moss TJ, Sloboda DM, Gurrin LC, Harding R, Challis JR, Newnham JP (2001) Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol***281**: R960-970

Mostyn A, Attig L, Larcher T, Dou S, Chavatte-Palmer P, Boukthir M, Gertler A, Djiane J, M ES, Abdennebi-Najar L (2014) UCP1 is present in porcine adipose tissue and is responsive to postnatal leptin. *J Endocrinol***223**: M31-38

Mulder IE, Schmidt B, Stokes CR, Lewis M, Bailey M, Aminov RI, Prosser JI, Gill BP, Pluske JR, Mayer CD, Musk CC, Kelly D (2009) Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC biology***7**: 79

Murotsuki J, Challis JR, Han VK, Fraher LJ, Gagnon R (1997) Chronic fetal placental embolization and hypoxemia cause hypertension and myocardial hypertrophy in fetal sheep. *Am J Physiol***272**: R201-207

Myatt L (2006) Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol***572**: 25-30

Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi Y, Kagoshima T, Dohi K, Makita Z, Vlassara H, Bucala R (1993) Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol***143**: 1649-1656

Ndisang JF, Lane N, Jadhav A (2008) Crosstalk between the heme oxygenase system, aldosterone, and phospholipase C in hypertension. *Journal of hypertension***26**: 1188-1199

Newman RB (2002) Fetal surveillance and timing of delivery in triplet gestations. *Triplet pregnancies and their consequences*: Ed. Keith L.G and Blickstein I., section II, 107-120

Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR (1998) Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest***101**: 2174-2181

Ohgami N NR, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H (2001) Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* **276(5)**: 3195-3202.

Ohgami N NR, Ikemoto M, Arai H, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, Nakayama H: CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications* 2002, 16(1):56-59. (2002) CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications* **16(1)**: 56-59.

Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, Atkins RC, Osicka T, Jerums G, Cooper ME (2001) Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest***108**: 1853-1863

Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science***336**: 489-493

Ong KK (2006) Size at birth, postnatal growth and risk of obesity. *Hormone research***65 Suppl 3**: 65-69

Organization WH (2012) Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health.

Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ (1993) Early growth and death from cardiovascular disease in women. *Bmj***307**: 1519-1524

Osrin D, Vaidya A, Shrestha Y, Baniya RB, Manandhar DS, Adhikari RK, Filteau S, Tomkins A, Costello AM (2005) Effects of antenatal multiple micronutrient supplementation on birthweight and gestational duration in Nepal: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet***365**: 955-962

Ounsted M, Scott A, Moar VA (1988) Constrained and unconstrained fetal growth: associations with some biological and pathological factors. *Ann Hum Biol***15**: 119-129

Ozanne SE (2001) Metabolic programming in animals. *British medical bulletin***60**: 143-152

Ozanne SE, Hales CN (1999) The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc***58**: 615-619

Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S, Vaag AA (2005) Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia***48**: 547-552

P. S. Sharp SR, and S. Mukherjee, (2003) Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabetic Medicine* **vol. 20, no. 7, : pp. 575–579**

Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA (2008) Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest***118**: 2316-2324

Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D, Schmidt AM (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med***4**: 1025-1031

Pastoriza S, Rufian-Henares JA (2014) Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. *Food Chem***164**: 438-445

Pere MC, Etienne M (2000) Uterine blood flow in sows: effects of pregnancy stage and litter size. *Reproduction, nutrition, development***40**: 369-382

Persson E, Jansson T (1992) Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. *Acta physiologica Scandinavica***145**: 195-196

Phillips DI, Hirst S, Clark PM, Hales CN, Osmond C (1994) Fetal growth and insulin secretion in adult life. *Diabetologia***37**: 592-596

Phipps K, Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Clark PM (1993) Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia***36**: 225-228

Pischetsrieder M, Henle T (2012) Glycation products in infant formulas: chemical, analytical and physiological aspects. *Amino Acids***42**: 1111-1118

Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW (2009) Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol***587**: 4963-4976

Poore KR, Fowden AL (2003) The effect of birth weight on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *J Physiol***547**: 107-116

Potier P, Sasaki A, Bakala J, Garcia-Alvarez MC, Franck G, Nhiri N, Wang Q, Ermolenko L, Nguefeu Y, Calvo F, Gautier JF (2005) [New aspects of diabetes]. *Ann Pharm Fr***63**: 371-384

R.V. Salamon Zm, Zs. Csapó-Kiss, A. Győri, Z. Gyrői, J. Csapó (2009) Changes in fatty acid composition of

diferent milk products caused by diferent

technology. *Acta Univ Sapientiae, Alimentaria 2, 1*: 101-109

Rabbani N, Thornalley PJ (2010) Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids***42**: 1087-1096

Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *The American journal of clinical nutrition***70**: 811-816

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW (1976) Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England journal of medicine***295**: 349-353

Rerat A, Calmes R, Vaissade P, Finot PA (2002) Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *Eur J Nutr***41**: 1-11

Reynolds TM (1965) Chemistry of nonenzymic browning. II. *Adv Food Res***14**: 167-283

Riboulet-Bisson E, Sturme MH, Jeffery IB, O'Donnell MM, Neville BA, Forde BM, Claesson MJ, Harris H, Gardiner GE, Casey PG, Lawlor PG, O'Toole PW, Ross RP (2012) Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *PLoS One***7**: e31113

Rochelson B, Kaplan C, Guzman E, Arato M, Hansen K, Trunca C (1990) A quantitative analysis of placental vasculature in the third-trimester fetus with autosomal trisomy. *Obstetrics and gynecology***75**: 59-63

Roncero-Ramos I, Delgado-Andrade C, Tessier FJ, Niquet-Leridon C, Strauch C, Monnier VM, Navarro MP (2013) Metabolic transit of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food Funct***4**: 1032-1039

Roseboom TJ, Painter RC, van Abeelen AF, Veenendaal MV, de Rooij SR (2011) Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas***70**: 141-145

Rurian-Henares JA, Morales FJ (2008) Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. *J Agric Food Chem***56**: 2357-2362

Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO (2007) Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocrine reviews***28**: 219-251

Schinzel R, Munch G, Heidland A, Sebekova K (2001) Advanced glycation end products in end-stage renal disease and their removal. *Nephron***87**: 295-303

Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG (1997) Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest***99**: 457-468

Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, et al. (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem***267**: 14987-14997

Schmidt IM, Chellakooty M, Boisen KA, Damgaard IN, Mau Kai C, Olgaard K, Main KM (2005) Impaired kidney growth in low-birth-weight children: distinct effects of maturity and weight for gestational age. *Kidney international***68**: 731-740

Schokker D, Zhang J, Vastenhouw SA, Heilig HG, Smidt H, Rebel JM, Smits MA (2015) Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. *PLoS One***10**: e0116523

Scholl TO, Sowers M, Chen X, Lenders C (2001) Maternal glucose concentration influences fetal growth, gestation, and pregnancy complications. *American journal of epidemiology***154**: 514-520

Sebekova K, Kupcova V, Schinzel R, Heidland A (2002) Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis - amelioration by liver transplantation. *J Hepatol***36**: 66-71

Sebekova K, Podracka L, Blazicek P, Syrova D, Heidland A, Schinzel R (2001) Plasma levels of advanced glycation end products in children with renal disease. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)***16**: 1105-1112

Sebekova K, Saavedra G, Zumpfe C, Somoza V, Klenovicsova K, Birlouez-Aragon I (2008) Plasma concentration and urinary excretion of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in breast milk- and formula-fed infants. *Annals of the New York Academy of Sciences***1126**: 177-180

Seiquer I, Diaz-Alguacil J, Delgado-Andrade C, Lopez-Frias M, Munoz Hoyos A, Galdo G, Navarro MP (2006) Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *The American journal of clinical nutrition***83**: 1082-1088

Seiquer I, Rubio LA, Peinado MJ, Delgado-Andrade C, Navarro MP (2014) Maillard reaction products modulate gut microbiota composition in adolescents. *Mol Nutr Food Res***58**: 1552-1560

Serban AI, Stanca L, Geicu OI, Dinischiotu A (2015) AGEs-Induced IL-6 Synthesis Precedes RAGE Up-Regulation in HEK 293 Cells: An Alternative Inflammatory Mechanism? *International journal of molecular sciences***16**: 20100-20117

Simmons RA (2006) Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med***40**: 917-922

Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ (2001) Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes***50**: 2279-2286

Skinner MK, Guerrero-Bosagna C, Haque M, Nilsson E, Bhandari R, McCarrey JR (2013) Environmentally induced transgenerational epigenetic reprogramming of primordial germ cells and the subsequent germ line. *PLoS One***8**: e66318

Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ (1990) Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate***57**: 107-118

Sobenin IA, Tertov VV, Koschinsky T, Bunting CE, Slavina ES, Dedov, II, Orekhov AN (1993) Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells. *Atherosclerosis***100**: 41-54

Somoza V, Lindenmeier M, Hofmann T, Frank O, Erbersdobler HF, Baynes JW, Thorpe SR, Heidland A, Zill H, Bek S, Huber J, Weigle T, Scheidler S, Busch AE, Sebekova K (2005) Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats. *Annals of the New York Academy of Sciences***1043**: 492-500

Somoza V, Wenzel E, Weiss C, Clawin-Radecker I, Grubel N, Erbersdobler HF (2006) Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Mol Nutr Food Res***50**: 833-841

Soriani M, Pietraforte D, Minetti M (1994) Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Archives of biochemistry and biophysics***312**: 180-188

Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA (2008) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes***57**: 2461-2469

Soulis-Liparota T, Cooper ME, Dunlop M, Jerums G (1995) The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia***38**: 387-394

Stettler N, Stallings VA, Troxel AB, Zhao J, Schinnar R, Nelson SE, Ziegler EE, Strom BL (2005) Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation***111**: 1897-1903

Stitt AW, He C, Friedman S, Scher L, Rossi P, Ong L, Founds H, Li YM, Bucala R, Vlassara H (1997) Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. *Mol Med***3**: 617-627

Stocker C, O'Dowd J, Morton NM, Wargent E, Sennitt MV, Hislop D, Glund S, Seckl JR, Arch JR, Cawthorne MA (2004) Modulation of susceptibility to weight gain and insulin resistance in low birthweight rats by treatment of their mothers with leptin during pregnancy and lactation. *Int J Obes Relat Metab Disord***28**: 129-136

Street ME, Seghini P, Fieni S, Ziveri MA, Volta C, Martorana D, Viani I, Gramellini D, Bernasconi S (2006) Changes in interleukin-6 and IGF system and their relationships in placenta and cord blood in newborns with fetal growth restriction compared with controls. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies***155**: 567-574

Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ, Holness MJ (2001) Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies***145**: 529-539

Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature***405**: 354-360

Tessier FJ (2010) The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathologie Biologie* **58**: 214–219.

Tessier FJ, & Birlouez-Aragon, I. (2012) Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids* **42(4)**: 1119–1131.

Thamotharan M, Shin BC, Suddirikku DT, Thamotharan S, Garg M, Devaskar SU (2005) GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**: E935-947

Tomas J, Langella P, Cherbuy C (2012) The intestinal microbiota in the rat model: major breakthroughs from new technologies. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* **13**: 54-63

Tuohy KM, Hinton DJ, Davies SJ, Crabbe MJ, Gibson GR, Ames JM (2006) Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota--implications for health. *Mol Nutr Food Res* **50**: 847-857

Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R, Otani H (2007) Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. *Congenital anomalies* **47**: 77-83

Underwood MA, Kalanetra KM, Bokulich NA, Mirmiran M, Barile D, Tancredi DJ, German JB, Lebrilla CB, Mills DA (2014) Prebiotic oligosaccharides in premature infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **58**: 352-360

Uribarri J, Peppas M, Cai W, Goldberg T, Lu M, Baliga S, Vassalotti JA, Vlassara H (2003) Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *Am J Kidney Dis* **42**: 532-538

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H (2010) Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* **110**: 911-916 e912

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM (1996) Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* **14**: 95-97

Valdez R, Athens MA, Thompson GH, Bradshaw BS, Stern MP (1994) Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* **37**: 624-631

Valera A, Pujol A, Pelegrin M, Bosch F (1994) Transgenic mice overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase develop non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A***91**: 9151-9154

Van Puyvelde K MT, Njemini R, Beyer I, Bautmans I. (2014) Effect of advanced glycation end product intake on inflammation and aging: a systematic review. *Nutr Rev***72(10)**: 638-650

Veenendaal MV, Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, van der Post JA, Gluckman PD, Hanson MA, Roseboom TJ (2013) Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *Bjog***120**: 548-553

Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J (2001) Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney international***59**: 238-245

Vermeil G, Arsan A, Du Fraysseix M, Dartois A-M (2003) *Alimentation de l'enfant de la naissance à 3 ans*: Wolters Kluwer France.

Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab***279**: E83-87

Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M (2008) The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology***149**: 1906-1913

Viegas OA, Scott PH, Cole TJ, Eaton P, Needham PG, Wharton BA (1982) Dietary protein energy supplementation of pregnant Asian mothers at Sorrento, Birmingham. II: Selective during third trimester only. *British medical journal (Clinical research ed)***285**: 592-595

Vlassara H, Brownlee M, Cerami A (1985) High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A***82**: 5588-5592

Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppia M, Rayfield EJ (2002) Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A***99**: 15596-15601

Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, Zhu L, Neade T, Beeri M, Silverman JM, Ferrucci L, Tansman L, Striker GE, Uribarri J (2009) Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab***94**: 4483-4491

Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R (1992) Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A***89**: 12043-12047

Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M (1994) Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A***91**: 11704-11708

Vlassara H, Uribarri J (2014) Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep***14**: 453

Voreades N, Kozil A, Weir TL (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol***5**: 494

Vuguin P, Raab E, Liu B, Barzilai N, Simmons R (2004) Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation. *Diabetes***53**: 2617-2622

Wang H, Jenner AM, Lee CY, Shui G, Tang SY, Whiteman M, Wenk MR, Halliwell B (2007) The identification of antioxidants in dark soy sauce. *Free Radic Res***41**: 479-488

Wautier MP, Tessier FJ, Wautier JL (2014) [Advanced glycation end products: A risk factor for human health]. *Ann Pharm Fr***72**: 400-408

Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, Jenkins DG, Stein G, Schmidt AM, Yan SF (2006) RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis***185**: 70-77

Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Rong LL, Moser B, Markowitz GS, Stein G, Bierhaus A, Liliensiek B, Arnold B, Nawroth PP, Stern DM, D'Agati VD, Schmidt AM (2003) RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol***162**: 1123-1137

Weng M, Walker WA (2013) The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of developmental origins of health and disease***4**: 203-214

WHO. (2012) No health without research. Geneva.

Wilkins BH (1992) Renal function in sick very low birthweight infants: 2. Urea and creatinine excretion. *Archives of disease in childhood***67**: 1146-1153

Wilson MR, Hughes SJ (1997) The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J Endocrinol***154**: 177-185

Wintour EM, Moritz KM, Johnson K, Ricardo S, Samuel CS, Dodic M (2003) Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J Physiol***549**: 929-935

Wolffe AP, Matzke MA (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science***286**: 481-486

Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD (1996) Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatric research***40**: 438-443

Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R (2001) Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatric research***49**: 460-467

Wu BB, Yang Y, Xu X, Wang WP (2015) Effects of Bifidobacterium supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World journal of pediatrics : WJP*

Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE (2006) Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J Anim Sci***84**: 2316-2337

Yajnik CS (2004) Obesity epidemic in India: intrauterine origins? *Proc Nutr Soc***63**: 387-396

Yoshida N, Okumura K, Aso Y (2005) High serum pentosidine concentrations are associated with increased arterial stiffness and thickness in patients with type 2 diabetes. *Metabolism***54**: 345-350

Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S (2005) Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell metabolism***1**: 371-378

Zerfu TA, Ayele HT (2013) Micronutrients and pregnancy; effect of supplementation on pregnancy and pregnancy outcomes: a systematic review. *Nutrition journal***12**: 20

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* **6**: 237ra265

Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW (1986) Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* **261**: 4889-4894

Ahmed N, Mirshekar-Syahkal B, Kennish L, Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Thornalley PJ (2005) Assay of advanced glycation endproducts in selected beverages and food by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Mol Nutr Food Res* **49**: 691-699

AL Drash, MS Kramer, J Swanson, Udall J (1994) Infant feeding practices and their possible relationship to the etiology of diabetes mellitus. American Academy of Pediatrics Work Group on Cow's Milk Protein and Diabetes Mellitus. *Pediatrics* **94**: 752-754

Alamir I, Niquet-Leridon C, Jacolot P, Rodriguez C, Orosco M, Anton PM, Tessier FJ (2013) Digestibility of extruded proteins and metabolic transit of N epsilon -carboxymethyllysine in rats. *Amino Acids* **44**: 1441-1449

Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A (2010) Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* **118**: 1243-1250

Ames J, & Wynne, A. (1999) The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations in vitro. . *British Journal of* **82(6)**: 489–495.

Arisawa K, Takeda H, Mikasa H (2005) Background exposure to PCDDs/PCDFs/PCBs and its potential health effects: a review of epidemiologic studies. *J Med Invest* **52**: 10-21

Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown EM, Finlay B (2014)
) The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Front Immunol* **5**: 427

ARSAN A. VG, DARTOIS A.M., DU FRAYSSEIX M. (2011) Alimentation de l'enfant de la naissance à 3 ans. **5ème édition. Paris : Editions Doin, : 222**

Attig L, Brisard D, Larcher T, Mickiewicz M, Guilloteau P, Boukthir S, Niamba CN, Gertler A, Djiane J, Monniaux D, Abdennebi-Najar L (2013a) Postnatal Leptin Promotes Organ Maturation and Development in IUGR Piglets. *PloS one* **8**: e64616

Attig L, Djiane J, Gertler A, Rampin O, Larcher T, Boukthir S, Anton PM, Madec JY, Gourdou I, Abdennebi-Najar L (2008a) Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-weight piglets and effects of leptin supplementation on neonatal growth and development. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **295**: E1117-1125

Attig L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, Gertler A, Djiane J (2008b) Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *International journal of obesity* **32**: 1153-1160

Attig L, Vige A, Gabory A, Karimi M, Beauger A, Gross MS, Athias A, Gallou-Kabani C, Gambert P, Ekstrom TJ, Jais JP, Junien C (2013b) Dietary alleviation of maternal obesity and

diabetes: increased resistance to diet-induced obesity transcriptional and epigenetic signatures. *PloS one* **8**: e66816

Ayodele OE, Alebiosu CO, Salako BL (2004) Diabetic nephropathy--a review of the natural history, burden, risk factors and treatment. *J Natl Med Assoc* **96**: 1445-1454

B. AJL (1987) Le lactose. In: CEPIL. Le lait matière première de l'industrie alimentaire. *INRA*, : p. 99-111.

Baillie-Hamilton PF (2002) Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med* **8**: 185-192

Barker DJ (1990) The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* **301**: 1111

Barker DJ (2004) The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* **23**: 588S-595S

Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME (1989) Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Bmj* **298**: 564-567

Barr DB, Bishop A, Needham LL (2007) Concentrations of xenobiotic chemicals in the maternal-fetal unit. *Reprod Toxicol* **23**: 260-266

Bauer J, Gerss J (2011) Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr* **30**: 215-220

Bauer R, Walter B, Bauer K, Klupsch R, Patt S, Zwiener U (2002) Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets. *Acta Physiol Scand* **176**: 83-90

Baumann M, Stehouwer C, Scheijen J, Heemann U, Struijker Boudier H, Schalkwijk C (2008) N epsilon-(carboxymethyl)lysine during the early development of hypertension. *Ann N Y Acad Sci* **1126**: 201-204

Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A, Canatan H (2002) Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res* **33**: 276-280

Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, Bucala R, Vlassara H (1995) Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* **44**: 824-829

Bell DS (2003) Heart failure: the frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. *Diabetes Care* **26**: 2433-2441

Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR (1993) Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* **341**: 339-341

Berg TJ, Clausen JT, Torjesen PA, Dahl-Jorgensen K, Bangstad HJ, Hanssen KF (1998) The advanced glycation end product N-epsilon-(carboxymethyl)lysine is increased in serum from children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* **21**: 1997-2002

Bergmann R, Helling, R., Heichert, C., Scheunemann, M., Mading, P., Wittrisch, H., Johannsen B, Henle, T., . (2001) Radio fluorination and positron emission tomography (PET) as a new approach to study the in vivo distribution and elimination of the advanced glycation endproducts N-epsilon-carboxymethyllysine (CML) and N-epsilon-carboxyethyllysine (CEL). *Nahrung* **45**: 182-188.

Birlouez-Aragon I, Saavedra G, Tessier FJ, Galinier A, Ait-Ameur L, Lacoste F, Niamba CN, Alt N, Somoza V, Lecerf JM (2010) A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. *Am J Clin Nutr* **91**: 1220-1226

Birthweight L (2004) Country, regional and global estimates. *UNICEF, New York*

Bloomfield FH, Jaquiery AL, Oliver MH (2013) Nutritional regulation of fetal growth. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* **74**: 79-89

Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G (2005) Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**: F645-659

Boulanger E, Dequiedt P, Wautier JL (2002) [Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins?]. *Nephrologie* **23**: 351-359

Brownlee M (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* **46**: 223-234

Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**: 813-820

Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H (1994) Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9441-9445

Bucala R, Vlassara H (1995) Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis* **26**: 875-888

Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA (2007) Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* **97**: 1036-1046

Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, Going TC, Bailey RA (1997) Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest* **100**: 1768-1774

Cabanelas A, Lisboa PC, Moura EG, Pazos-Moura CC (2006) Leptin acute modulation of the 5'-deiodinase activities in hypothalamus, pituitary and brown adipose tissue of fed rats. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **38**: 481-485

Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Zheng F, Striker GE, Vlassara H (2008) Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *Am J Pathol* **173**: 327-336

Casals-Casas C, Feige JN, Desvergne B (2008) Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 6**: S53-61

Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A (1997) Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13915-13920

Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Newburg DS (2001) Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* **11**: 365-372

Che L, Xuan Y, Hu L, Liu Y, Xu Q, Fang Z, Lin Y, Xu S, Wu D, Zhang K, Chen D (2015) Effect of postnatal nutrition restriction on the oxidative status of neonates with intrauterine growth restriction in a pig model. *Neonatology* **107**: 93-99

Cherif H, Reusens B, Ahn MT, Hoet JJ, Remacle C (1998) Effects of taurine on the insulin secretion of rat fetal islets from dams fed a low-protein diet. *J Endocrinol* **159**: 341-348

Chomtho S, Wells JC, Williams JE, Lucas A, Fewtrell MS (2008) Associations between birth weight and later body composition: evidence from the 4-component model. *Am J Clin Nutr* **88**: 1040-1048

Chuyen NV (2006) Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: on the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Mol Nutr Food Res* **50**: 1140-1149

Cianfarani S, Germani D, Branca F (1999) Low birthweight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **81**: F71-73

Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, Laskowski A, Harcourt BE, Sourris KC, Tan AL, Fukami K, Thallas-Bonke V, Nawroth PP, Brownlee M, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM (2009) RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J Am Soc Nephrol* **20**: 742-752

Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, Kim SG, Li H, Gao Z, Mahana D, Zarate Rodriguez JG, Rogers AB, Robine N, Loke P, Blaser MJ (2014) Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* **158**: 705-721

Crace CJ, Swenne I, Milner RD (1991) Long-term effects on glucose tolerance and insulin secretory response to glucose following a limited period of severe protein or energy malnutrition in young rats. *Ups J Med Sci* **96**: 177-183

Cryer PE (2001) Hypoglycemia risk reduction in type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109 Suppl 2**: S412-423

D'Inca R, Gras-Le Guen C, Che L, Sangild PT, Le Huerou-Luron I (2011) Intrauterine growth restriction delays feeding-induced gut adaptation in term newborn pigs. *Neonatology* **99**: 208-216

Dabelea D, DeGroat J, Sorrelman C, Glass M, Percy CA, Avery C, Hu D, D'Agostino RB, Jr., Beyer J, Imperatore G, Testaverde L, Klingensmith G, Hamman RF (2009) Diabetes in Navajo youth: prevalence, incidence, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care* **32 Suppl 2**: S141-147

Dabelea D, Pettitt DJ, Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC (1999) Birth weight, type 2 diabetes, and insulin resistance in Pima Indian children and young adults. *Diabetes Care* **22**: 944-950

Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C, Gazzani G (2002) Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem* **50**: 1225-1229

Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M (2011) National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet* **378**: 31-40

Daum-Badouard C (2004) Les lésions de l'ADN: analyse dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant.

de Oliveira JC, Lisboa PC, de Moura EG, Barella LF, Miranda RA, Malta A, Franco CC, Ribeiro TA, Torrezan R, Gravena C, Mathias PC (2013) Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *J Endocrinol* **216**: 195-206

de Onis M, Blossner M, Villar J (1998) Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. *Eur J Clin Nutr* **52 Suppl 1**: S5-15

de Vos WM, de Vos EA (2012) Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr Rev* **70 Suppl 1**: S45-56

Delatour T, Hegele J, Parisod V, Richoz J, Maurer S, Steven M, Buetler T (2009) Analysis of advanced glycation endproducts in dairy products by isotope dilution liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. The particular case of carboxymethyllysine. *J Chromatogr A* **1216**: 2371-2381

Delgado-Andrade C, Tessier FJ, Niquet-Leridon C, Seiquer I, Pilar Navarro M (2012) Study of the urinary and faecal excretion of Nepsilon-carboxymethyllysine in young human volunteers. *Amino Acids* **43**: 595-602

Desai M, Byrne CD, Zhang J, Petry CJ, Lucas A, Hales CN (1997) Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet. *Am J Physiol* **272**: G1083-1090

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG (2005) Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**: R91-96

Dittrich R, Hoffmann I, Stahl P, Muller A, Beckmann MW, Pischetsrieder M (2006) Concentrations of N-epsilon-carboxymethyllysine in human breast milk, infant formulas, and urine of infants. *J Agric Food Chem* **54**: 6924-6928

Dore J, Corthier G (2007) [The human intestinal microbiota]. *Gastroenterol Clin Biol* **34 Suppl 1**: S7-15

Drusch S, Faist V, Erbersdobler H.F. (1999) Determination of N-epsilon-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chem* **65**: 547-553.

Edwards LJ, McMillen IC (2001) Maternal undernutrition increases arterial blood pressure in the sheep fetus during late gestation. *J Physiol* **533**: 561-570

El-Khattabi I, Gregoire F, Remacle C, Reusens B (2003) Isocaloric maternal low-protein diet alters IGF-I, IGF-BPs, and hepatocyte proliferation in the fetal rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**: E991-E1000

Elmhiri G, Barella LF, Vieau D, Camous S, Mathias PC, Abdennebi-Najar L (2014) Acute exposure to a precursor of advanced glycation end products induces a dual effect on the rat pancreatic islet function. *Int J Endocrinol* **2014**: 378284

Erbersdobler HF DB, Nangpal A, Reuter H (1987) Determination of furosine in heated milk as a measure of heat intensity during processing. *J Dairy Res* **54**: 147-151

Eriksson J, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker D (2000) Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension* **36**: 790-794

Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ (1999) Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *Bmj* **318**: 427-431

Fanca-Berthon P, Hoebler C, Mouzet E, David A, Michel C (2010) Intrauterine growth restriction not only modifies the cecocolonic microbiota in neonatal rats but also affects its activity in young adult rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **51**: 402-413

FAO. (1998) Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine.

FAO. (consulté le 2 novembre 2013) Food and Agriculture Organization, département de l'agriculture. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. *[en ligne]* <http://www.fao.org/docrep/t4280f/t4280f04.htm>

Fehmann HC, Peiser C, Bode HP, Stamm M, Staats P, Hedetoft C, Lang RE, Goke B (1997) Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides* **18**: 1267-1273

Finot PA, Magnenat, E. (1981) Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog Food Nutr Sci* **5**, **Sci. 5**: 193–207.

Fleischer Michaelsen K, Weaver L, Francesco B, Aileen R (2000) Feeding and nutrition of infants and young children. *WHO regional publications European series* **87**

Flint HJ (2012) The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutr Rev* **70 Suppl 1**: S10-13

Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Mogensen TH, Paludan SR, Rasch R (2004) Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* **53**: 166-172

Forbes JM, Soulis T, Thallas V, Panagiotopoulos S, Long DM, Vasan S, Wagle D, Jerums G, Cooper ME (2001) Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetologia* **44**: 108-114

Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D (2000) The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med* **133**: 176-182

Fowden AL, Forhead AJ (2004) Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* **127**: 515-526

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ (2006) Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* **21**: 29-37

Frangne R, Adrian J (1972) [Maillard's reaction. 6. Reactivity of various purified proteins]. *Ann Nutr Aliment* **26**: 97-106

Friedman EA (1999) Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* **22 Suppl 2**: B65-71

Friedman MM (1996) Problematic standards: staff rights and nutritional assessments. *Home Healthc Nurse* **14**: 108-110

Friis H, Gomo E, Nyazema N, Ndhlovu P, Krarup H, Kaestel P, Michaelsen KF (2004) Effect of multimicronutrient supplementation on gestational length and birth size: a randomized, placebo-controlled, double-blind effectiveness trial in Zimbabwe. *Am J Clin Nutr* **80**: 178-184

Garofano A, Czernichow P, Breant B (1997) In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* **40**: 1231-1234

Gatford KL, Wintour EM, De Blasio MJ, Owens JA, Dodic M (2000) Differential timing for programming of glucose homeostasis, sensitivity to insulin and blood pressure by in utero exposure to dexamethasone in sheep. *Clin Sci (Lond)* **98**: 553-560

Gauster M, Hiden U, Blaschitz A, Frank S, Lang U, Alvino G, Cetin I, Desoye G, Wadsack C (2007) Dysregulation of placental endothelial lipase and lipoprotein lipase in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 2256-2263

Gennser G, Rymark P, Isberg PE (1988) Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br Med J (Clin Res Ed)* **296**: 1498-1500

Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* **125**: 1401-1412

Gniechwitz D, Reichardt N, Meiss E, Ralph J, Steinhart H, Blaut M, Bunzel M (2008) Characterization and fermentability of an ethanol soluble high molecular weight coffee fraction. *J Agric Food Chem* **56**: 5960-5969

Godfrey K, Robinson S, Barker DJ, Osmond C, Cox V (1996) Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *Bmj* **312**: 410-414

Goldenberg RL, Culhane JF, Johnson DC (2005) Maternal infection and adverse fetal and neonatal outcomes. *Clin Perinatol* **32**: 523-559

Gougoux A (2005) Physiologie des reins et des liquides corporels. *ed MultiMondes, Québec* 336

Gugliucci A, Bendayan M (1996) Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* **39**: 149-160

Gupta P, Ray M, Dua T, Radhakrishnan G, Kumar R, Sachdev HP (2007) Multimicronutrient supplementation for undernourished pregnant women and the birth size of their offspring: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arch Pediatr Adolesc Med* **161**: 58-64

Guyton A CaJEH (2006.) Textbook of Medical Physiology. . *Ile ed ed E Saunders Philadelphia*

Hales CN, Barker DJ (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* **35**: 595-601

Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED (1999) Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia* **42**: 728-736

Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, Lu Y, Rosario RH, Oruganti S, Nikolla Z, Belov D, Lalla E, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2008) Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest* **118**: 183-194

Hasenkopf K, Ubel B, Bordiehn T, Pischetsrieder M (2001) Determination of the Maillard product oxalic acidmonolysinylamide (OMA) in heated milk products by ELISA. *Nahrung* **45**: 206-209

He C, Sabol, J., Mitsuhashi, T., Vlassara, H. (1999) Dietary glycotoxins: inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes* **48**: 1308–1315

Helou C (2014a) Teneur en produits de Maillard dans le pain en fonction de la qualité de la matière première et du procédé de panification: Effets des mélanoïdines du pain sur le microbiote intestinal *Thèse*

Helou C, Marier, D., Jacolot, P., Abdennebi-Najar, L., Niquet-Léridon, C., Tessier, F. J., & Gadonna-Widehem, P. (2014b) Microorganisms and Maillard reaction products: a review of the literature and recent findings. *Amino Acids* **46(2)**, : 267–277.

Hendrix N, Berghella V (2008) Non-placental causes of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol* **32**: 161-165

Henle T (2003a) AGEs in foods: do they play a role in uremia? *Kidney Int Suppl*: S145-147

Henle T, Miyata, T., 2003. . (2003b) Advanced glycation end products in uremia. *Adv Ren Repl Ther* **10**, : 321–331

Henle T SU, Klostermeyer H (1997) Detection and quantification of pentosidine in foods. . *Z Lebensm Unters Forsch A* **204**:: 95-98

Herpin P, J. LD (1998) Conséquences de l'augmentation de la prolificité des truies sur la survie et la croissance du porcelet. *INRA Productions Animales*: 253-255

Hodge JE (1953) Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem* **1(15)**: 928–943 doi:910.1021/jf60015a60004

Hoegerman G, Wilson CA, Thurmond E, Schnoll SH (1990) Drug-exposed neonates. *West J Med* **152**: 559-564

Hofmann SM, Dong HJ, Li Z, Cai W, Altomonte J, Thung SN, Zeng F, Fisher EA, Vlassara H (2002) Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes* **51**: 2082-2089

Hofmann T, Bors W, Stettmaier K (1999) Radical-assisted melanoidin formation during thermal processing of foods as well as under physiological conditions. *J Agric Food Chem* **47**: 391-396

Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL (1995) Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res* **38**: 267-271

Holemans K, Verhaeghe J, Dequeker J, Van Assche FA (1996) Insulin sensitivity in adult female rats subjected to malnutrition during the perinatal period. *J Soc Gynecol Investig* **3**: 71-77

Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA (1998) Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* **32**: 387-392

Hull GLJ, Woodside, J. V., Ames, J. M., & Cuskelly, G. J. (2012) Nε-(carboxymethyl)lysine content of foods commonly consumed in a Western style diet. *Food Chemistry* **131(1)**: 170–174

Ibanez L, Valls C, Ong K, Dunger DB, de Zegher F (2006) Metformin therapy during puberty delays menarche, prolongs pubertal growth, and augments adult height: a randomized study in low-birth-weight girls with early-normal onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 2068-2073

Isabelle. M-G (2001) Critères de choix concernant l'alimentation du nouveau-né: A ce propos, enquête prospective de 308 femmes menée en ville. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine Université d'Angers*: 151p

ISPED. (2013) La composition des différents laits de mammifères, boissons végétales et préparations pour nourrissons.

Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-254

Jansson T, Lambert GW (1999) Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3-4 months of age. *J Hypertens* **17**: 1239-1248

Jansson T, Powell TL (2007) Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)* **113**: 1-13

Jaquet D, Gaboriau A, Czernichow P, Levy-Marchal C (2000) Insulin resistance early in adulthood in subjects born with intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 1401-1406

Jarvenpaa J, Vuoristo JT, Savolainen ER, Ukkola O, Vaskivuo T, Ryyanen M (2007) Altered expression of angiogenesis-related placental genes in pre-eclampsia associated with intrauterine growth restriction. *Gynecol Endocrinol* **23**: 351-355

Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodriguez JM (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* **51**: 270-274

Jimenez E, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernandez L, Rodriguez JM (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* **159**: 187-193

Karlberg J, Albertsson-Wikland K (1995) Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res* **38**: 733-739

Katz J, Lee AC, Kozuki N, Lawn JE, Cousens S, Blencowe H, Ezzati M, Bhutta ZA, Marchant T, Willey BA, Adair L, Barros F, Baqui AH, Christian P, Fawzi W, Gonzalez R,

-
- Humphrey J, Huybregts L, Kolsteren P, Mongkolchat A, Mullany LC, Ndyomugenyi R, Nien JK, Osrin D, Roberfroid D, Sania A, Schmiegelow C, Silveira MF, Tielsch J, Vaidya A, Velaphi SC, Victora CG, Watson-Jones D, Black RE (2013) Mortality risk in preterm and small-for-gestational-age infants in low-income and middle-income countries: a pooled country analysis. *Lancet* **382**: 417-425
- Kay HH, Grindle KM, Magness RR (2000) Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am J Obstet Gynecol* **182**: 682-688
- KCM Frank Kneepkens LP, P Brand (5 Feb 2010) Breastfeeding and the prevention of allergy. *Eur J pediatr*
- Khan NA, Kazzi SN (2000) Yield and costs of screening growth-retarded infants for torch infections. *Am J Perinatol* **17**: 131-135
- Kind KL, Clifton PM, Grant PA, Owens PC, Sohlstrom A, Roberts CT, Robinson JS, Owens JA (2003) Effect of maternal feed restriction during pregnancy on glucose tolerance in the adult guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **284**: R140-152
- Kind KL, Roberts CT, Sohlstrom AI, Katsman A, Clifton PM, Robinson JS, Owens JA (2005) Chronic maternal feed restriction impairs growth but increases adiposity of the fetal guinea pig. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**: R119-126
- Kind KL, Simonetta G, Clifton PM, Robinson JS, Owens JA (2002) Effect of maternal feed restriction on blood pressure in the adult guinea pig. *Exp Physiol* **87**: 469-477
- King GL, Shiba T, Oliver J, Inoguchi T, Bursell SE (1994) Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. *Annu Rev Med* **45**: 179-188
- Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P (2000) Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **92**: 35-43
- Klenovics KS, Boor P, Somoza V, Celec P, Fogliano V, Sebekova K (2013) Advanced glycation end products in infant formulas do not contribute to insulin resistance associated with their consumption. *PLoS One* **8**: e53056
- Kliman HJ (2014) Comment on "the placenta harbors a unique microbiome". *Sci Transl Med* **6**: 254le254
- Koenig RJ, Cerami A (1980) Hemoglobin A_{1c} and diabetes mellitus. *Annu Rev Med* **31**: 29-34
- Koletzko B, von Kries R, Closa R, Escribano J, Scaglioni S, Giovannini M, Beyer J, Demmelmair H, Gruszfeld D, Dobrzanska A, Sengier A, Langhendries JP, Rolland Cachera MF, Grote V (2009) Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age 2 y: a randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* **89**: 1836-1845

-
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H (1997) Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6474-6479
- Krajcovicova-Kudlackova M, Sebekova K, Schinzel R, Klvanova J (2002) Advanced glycation end products and nutrition. *Physiol Res* **51**: 313-316
- l'alimentation Cndcdéerslne, scientifique Cndlr, aliments Afdssd (2000) *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*: Tec & doc.
- LANCET (2000) Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. WHO Collaborative Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality. *Lancet* **355**: 451-455
- Langley-Evans SC (1997) Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J Hypertens* **15**: 537-544
- Langley-Evans SC, Nwagwu M (1998) Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life Sci* **63**: 605-615
- Langley SC, Browne RF, Jackson AA (1994a) Altered glucose tolerance in rats exposed to maternal low protein diets in utero. *Comp Biochem Physiol Physiol* **109**: 223-229
- Langley SC, Seakins M, Grimble RF, Jackson AA (1994b) The acute phase response of adult rats is altered by in utero exposure to maternal low protein diets. *J Nutr* **124**: 1588-1596
- Lapolla A, Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, Baccarin L, Laverda B, Fedele D (2007) Advanced glycation end products and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral artery disease. *Diabetes Care* **30**: 670-676
- Lebeuf Y. MJ-C, Moineau S. (2002) Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. *Science et technologie du lait*
- Leclerc E, Fritz G, Vetter SW, Heizmann CW (2009) Binding of S100 proteins to RAGE: an update. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 993-1007
- Lee EJ, Park EY, Mun H, Chang E, Ko JY, Kim do Y, Park JH (2015a) Soluble receptor for advanced glycation end products inhibits disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease by down-regulating cell proliferation. *Faseb j* **29**: 3506-3514
- Lee SA, Lim JY, Kim BS, Cho SJ, Kim NY, Kim OB, Kim Y (2015b) Comparison of the gut microbiota profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequencing. *Nutr Res Pract* **9**: 242-248
- Lees H, Swann J, Poucher SM, Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID, Marchesi JR (2014) Age and microenvironment outweigh genetic influence on the Zucker rat microbiome. *PLoS One* **9**: e100916

Leger J, Levy-Marchal C, Bloch J, Pinet A, Chevenne D, Porquet D, Collin D, Czernichow P (1997) Reduced final height and indications for insulin resistance in 20 year olds born small for gestational age: regional cohort study. *Bmj* **315**: 341-347

Leger J, Noel M, Limal JM, Czernichow P (1996) Growth factors and intrauterine growth retardation. II. Serum growth hormone, insulin-like growth factor (IGF) I, and IGF-binding protein 3 levels in children with intrauterine growth retardation compared with normal control subjects: prospective study from birth to two years of age. Study Group of IUGR. *Pediatr Res* **40**: 101-107

Leon DA, Johansson M, Rasmussen F (2000) Gestational age and growth rate of fetal mass are inversely associated with systolic blood pressure in young adults: an epidemiologic study of 165,136 Swedish men aged 18 years. *Am J Epidemiol* **152**: 597-604

Levy-Marchal C, Karjalainen J, Dubois F, Karges W, Czernichow P, Dosch HM (1995) Antibodies against bovine albumin and other diabetes markers in French children. *Diabetes Care* **18**: 1089-1094

Limesand SW, Jensen J, Hutton JC, Hay WW, Jr. (2005) Diminished beta-cell replication contributes to reduced beta-cell mass in fetal sheep with intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**: R1297-1305

Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR (1996) Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* **39**: 1299-1305

Lipkind HS, Curry AE, Huynh M, Thorpe LE, Matte T (2010) Birth outcomes among offspring of women exposed to the September 11, 2001, terrorist attacks. *Obstet Gynecol* **116**: 917-925

Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, Lithell UB, Leon DA (1996) Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *Bmj* **312**: 406-410

Lucas A (1991) Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* **156**: 38-50; discussion 50-35

Lucas A (1998) Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* **128**: 401S-406S

Lucas A, Boyes S, Bloom SR, Aynsley-Green A (1981) Metabolic and endocrine responses to a milk feed in six-day-old term infants: differences between breast and cow's milk formula feeding. *Acta Paediatr Scand* **70**: 195-200

Lumey LH (1992) Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944-1945. *Paediatr Perinat Epidemiol* **6**: 240-253

Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, Walker M (2006) Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* **66**: 38-44

Maessen DE, Stehouwer CD, Schalkwijk CG (2015) The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond)* **128**: 839-861

MAHAUT Michel JR, BRULE Gérard, SCHUCK Pierre. : (2000) Les produits industriels laitiers. . *Paris Editions TEC and Doc* , : p 178

Mahmood DF, Abderrazak A, El Hadri K, Simmet T, Rouis M (2013) The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* **19**: 1266-1303

Maillard LC (1912) Action des acides aminés sur les sucres; formation des mélanoidines par voie méthodique. . *Compte- Rendu de l'Académie Des Sciences* **154**: 66–68.

Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I (2000) Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* **58**: 770-773

Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, Chervenak FA, Figueras F, Grunebaum A, Puerto B, Skupski D, Stanojevic M (2008) Intrauterine restriction (IUGR). *J Perinat Med* **36**: 277-281

Martins SIFS, & van Boekel, M. a. J. S. (2003) Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction. *Food Chemistry* **83(1)**: 135–142

Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF (2013) Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol* **21**: 167-173

Mathias PC, Elmhiri G, de Oliveira JC, Delayre-Orthez C, Barella LF, Tofolo LP, Fabricio GS, Chango A, Abdennebi-Najar L (2014) Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. *European journal of nutrition* **53**: 711-722

Mauron J (1990) Influence of processing on protein quality. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **36 Suppl 1**: S57-69

McMillen IC, Robinson JS (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* **85**: 571-633

Mericq V, Piccardo C, Cai W, Chen X, Zhu L, Striker GE, Vlassara H, Uribarri J (2010) Maternally transmitted and food-derived glycotoxins: a factor preconditioning the young to diabetes? *Diabetes Care* **33**: 2232-2237

Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, Lelievre-Pegorier M, Leroy B (1994) Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *Pediatr Nephrol* **8**: 175-180

Michiels J, De Vos M, Missotten J, Owyn A, De Smet S, Van Ginneken C (2013) Maturation of digestive function is retarded and plasma antioxidant capacity lowered in fully weaned low birth weight piglets. *Br J Nutr* **109**: 65-75

Mickiewicz M, Zabielski R, Grenier B, Le Normand L, Savary G, Holst JJ, Oswald IP, Metges CC, Guilloteau P (2012) Structural and functional development of small intestine in intrauterine growth retarded porcine offspring born to gilts fed diets with differing protein ratios throughout pregnancy. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **63**: 225-239

Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K (1998) Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int* **53**: 416-422

Monteiro PO, Victora CG (2005) Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review. *Obes Rev* **6**: 143-154

Morise A, Seve B, Mace K, Magliola C, Le Huerou-luron I, Louveau I (2009) Impact of intrauterine growth retardation and early protein intake on growth, adipose tissue, and the insulin-like growth factor system in piglets. *Pediatr Res* **65**: 45-50

Moss TJ, Sloboda DM, Gurrin LC, Harding R, Challis JR, Newnham JP (2001) Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**: R960-970

Mostyn A, Attig L, Larcher T, Dou S, Chavatte-Palmer P, Boukthir M, Gertler A, Djiane J, M ES, Abdennebi-Najar L (2014) UCP1 is present in porcine adipose tissue and is responsive to postnatal leptin. *The Journal of endocrinology* **223**: M31-38

Murotsuki J, Challis JR, Han VK, Fraher LJ, Gagnon R (1997) Chronic fetal placental embolization and hypoxemia cause hypertension and myocardial hypertrophy in fetal sheep. *Am J Physiol* **272**: R201-207

Myatt L (2006) Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* **572**: 25-30

Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi Y, Kagoshima T, Dohi K, Makita Z, Vlassara H, Bucala R (1993) Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol* **143**: 1649-1656

Ndisang JF, Lane N, Jadhav A (2008) Crosstalk between the heme oxygenase system, aldosterone, and phospholipase C in hypertension. *J Hypertens* **26**: 1188-1199

Newman RB (2002) Fetal surveillance and timing of delivery in triplet gestations. *Triplet pregnancies and their consequences*: Ed. Keith L.G and Blickstein I., section II, 107-120

Nicholl ID, Bucala R (1998) Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **44**: 1025-1033

Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR (1998) Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* **101**: 2174-2181

O'Brien J, Morrissey PA (1989) Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* **28**: 211-248

OCDE. (2011) Etude de l'OCDE sur les taux d'allaitement.

Ohgami N NR, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H (2001.) Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* **276(5)**: 3195-3202.

Ohgami N NR, Ikemoto M, Arai H, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, Nakayama H: CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications* 2002, 16(1):56-59. (2002) CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). *J Diabetes Complications* **16(1)**: 56-59.

Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, Atkins RC, Osicka T, Jerums G, Cooper ME (2001) Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest* **108**: 1853-1863

OMS (2014) Profils des pays pour les maladies non transmissibles (MNT).

Ong KK (2006) Size at birth, postnatal growth and risk of obesity. *Horm Res* **65 Suppl 3**: 65-69

Organization WH (2012) Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health.

Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ (1993) Early growth and death from cardiovascular disease in women. *Bmj* **307**: 1519-1524

Osrin D, Vaidya A, Shrestha Y, Baniya RB, Manandhar DS, Adhikari RK, Filteau S, Tomkins A, Costello AM (2005) Effects of antenatal multiple micronutrient supplementation on birthweight and gestational duration in Nepal: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **365**: 955-962

Ounsted M, Scott A, Moar VA (1988) Constrained and unconstrained fetal growth: associations with some biological and pathological factors. *Ann Hum Biol* **15**: 119-129

Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG (2006) Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *Am J Clin Nutr* **84**: 1043-1054

Ozanne SE (2001) Metabolic programming in animals. *Br Med Bull* **60**: 143-152

Ozanne SE, Hales CN (1999) The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* **58**: 615-619

Ozanne SE, Jensen CB, Tingey KJ, Storgaard H, Madsbad S, Vaag AA (2005) Low birthweight is associated with specific changes in muscle insulin-signalling protein expression. *Diabetologia* **48**: 547-552

-
- P. S. Sharp SR, and S. Mukherjee, (2003) Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabetic Medicine* **vol. 20, no. 7**, : pp. 575–579
- Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA (2008) Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest* **118**: 2316-2324
- Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D, Schmidt AM (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* **4**: 1025-1031
- Peppia M, He C, Hattori M, McEvoy R, Zheng F, Vlassara H (2003) Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* **52**: 1441-1448
- Pere MC, Etienne M (2000) Uterine blood flow in sows: effects of pregnancy stage and litter size. *Reprod Nutr Dev* **40**: 369-382
- Persson E, Jansson T (1992) Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. *Acta Physiol Scand* **145**: 195-196
- Pettitt DJ, Forman MR, Hanson RL, Knowler WC, Bennett PH (1997) Breastfeeding and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Pima Indians. *Lancet* **350**: 166-168
- Phillips DI (2006) External influences on the fetus and their long-term consequences. *Lupus* **15**: 794-800
- Phillips DI, Hirst S, Clark PM, Hales CN, Osmond C (1994) Fetal growth and insulin secretion in adult life. *Diabetologia* **37**: 592-596
- Phipps K, Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Clark PM (1993) Fetal growth and impaired glucose tolerance in men and women. *Diabetologia* **36**: 225-228
- Pischetsrieder M, Henle T (2012) Glycation products in infant formulas: chemical, analytical and physiological aspects. *Amino Acids* **42**: 1111-1118
- Pisoschi AM PA (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* **97**:: 55-74
- Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW (2009) Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* **587**: 4963-4976
- Poore KR, Fowden AL (2003) The effect of birth weight on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *J Physiol* **547**: 107-116

-
- Potier P, Sasaki A, Bakala J, Garcia-Alvarez MC, Franck G, Nhiri N, Wang Q, Ermolenko L, Nguefeu Y, Calvo F, Gautier JF (2005) [New aspects of diabetes]. *Ann Pharm Fr* **63**: 371-384
- Poulsen MW, Hedegaard RV, Andersen JM, de Courten B, Bugel S, Nielsen J, Skibsted LH, Dragsted LO (2013) Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol* **60**: 10-37
- Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C (2011) Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics* **5**: 71-86
- R.V. Salamon Zm, Zs. Csapó-Kiss, A. Györi, Z. Gyrői, J. Csapó (2009) Changes in fatty acid composition of different milk products caused by different technology. *Acta Univ Sapientiae, Alimentaria* 2, 1: 101-109
- Rabbani N, Thornalley PJ (2010) Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids* **42**: 1087-1096
- Rajendiran S, Nimesh A, Ananthanarayanan PH, Dhiman P (2015) Markers of Oxidative Stress in Pregnant Women with Sleep Disturbances. *Oman Med J* **30**: 264-269
- Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* **70**: 811-816
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW (1976) Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* **295**: 349-353
- Rerat A, Calmes R, Vaissade P, Finot PA (2002) Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. Significance for man. *Eur J Nutr* **41**: 1-11
- Reynolds TM (1965) Chemistry of nonenzymic browning. II. *Adv Food Res* **14**: 167-283
- Roberfroid M (2007) Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* **137**: 830S-837S
- Rochelson B, Kaplan C, Guzman E, Arato M, Hansen K, Trunca C (1990) A quantitative analysis of placental vasculature in the third-trimester fetus with autosomal trisomy. *Obstet Gynecol* **75**: 59-63
- Rolland-Cachera MF, Deheeger M, Akrouf M, Bellisle F (1995) Influence of macronutrients on adiposity development: a follow up study of nutrition and growth from 10 months to 8 years of age. *Int J Obes Relat Metab Disord* **19**: 573-578
- Roseboom TJ, Painter RC, van Abeelen AF, Veenendaal MV, de Rooij SR (2011) Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine. *Maturitas* **70**: 141-145

Rurian-Henares JA, Morales FJ (2008) Antimicrobial activity of melanoidins against *Escherichia coli* is mediated by a membrane-damage mechanism. *J Agric Food Chem* **56**: 2357-2362

Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO (2007) Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev* **28**: 219-251

Scariati PD, Grummer-Strawn LM, Fein SB (1997) A longitudinal analysis of infant morbidity and the extent of breastfeeding in the United States. *Pediatrics* **99**: E5

Scheijen JL, Clevers E, Engelen L, Dagnelie PC, Brouns F, Stehouwer CD, Schalkwijk CG (2016) Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Presentation of a dietary AGE database. *Food Chem* **190**: 1145-1150

Schinzel R, Munch G, Heidland A, Sebekova K (2001) Advanced glycation end products in end-stage renal disease and their removal. *Nephron* **87**: 295-303

Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG (1997) Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* **99**: 457-468

Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, et al. (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* **267**: 14987-14997

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* **108**: 949-955

Schmidt IM, Chellakooty M, Boisen KA, Damgaard IN, Mau Kai C, Olgaard K, Main KM (2005) Impaired kidney growth in low-birth-weight children: distinct effects of maturity and weight for gestational age. *Kidney Int* **68**: 731-740

Schokker D, Zhang J, Vastenhouw SA, Heilig HG, Smidt H, Rebel JM, Smits MA (2015) Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. *PLoS One* **10**: e0116523

Scholl TO, Sowers M, Chen X, Lenders C (2001) Maternal glucose concentration influences fetal growth, gestation, and pregnancy complications. *Am J Epidemiol* **154**: 514-520

Schwartz A, Gruhl B, Lobnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M (2003) Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* **54**: 393-399

Sebekova K, Krajcovicova-Kudlackova M, Schinzel R, Faist V, Klvanova J, Heidland A (2001) Plasma levels of advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet. *Eur J Nutr* **40**: 275-281

-
- Sebekova K, Saavedra G, Zumpe C, Somoza V, Klenovicsova K, Birlouez-Aragon I (2008) Plasma concentration and urinary excretion of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in breast milk- and formula-fed infants. *Ann N Y Acad Sci* **1126**: 177-180
- Seiquer I, Diaz-Alguacil J, Delgado-Andrade C, Lopez-Frias M, Munoz Hoyos A, Galdo G, Navarro MP (2006) Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *Am J Clin Nutr* **83**: 1082-1088
- Seiquer I, Rubio LA, Peinado MJ, Delgado-Andrade C, Navarro MP (2014) Maillard reaction products modulate gut microbiota composition in adolescents. *Mol Nutr Food Res* **58**: 1552-1560
- Serban AI, Stanca L, Geicu OI, Dinischiotu A (2015) AGEs-Induced IL-6 Synthesis Precedes RAGE Up-Regulation in HEK 293 Cells: An Alternative Inflammatory Mechanism? *Int J Mol Sci* **16**: 20100-20117
- Simeoni U, Yzydorczyk C, Siddeek B, Benahmed M (2014) Epigenetics and neonatal nutrition. *Early Hum Dev* **90 Suppl 2**: S23-24
- Simmons RA (2006) Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **40**: 917-922
- Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ (2001) Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* **50**: 2279-2286
- Skinner MK, Guerrero-Bosagna C, Haque M, Nilsson E, Bhandari R, McCarrey JR (2013) Environmentally induced transgenerational epigenetic reprogramming of primordial germ cells and the subsequent germ line. *PLoS One* **8**: e66318
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ (1990) Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* **57**: 107-118
- Sobenin IA, Tertov VV, Koschinsky T, Bunting CE, Slavina ES, Dedov, II, Orekhov AN (1993) Modified low density lipoprotein from diabetic patients causes cholesterol accumulation in human intimal aortic cells. *Atherosclerosis* **100**: 41-54
- Somoza V, Wenzel E, Weiss C, Clawin-Radecker I, Grubel N, Erbersdobler HF (2006) Dose-dependent utilisation of casein-linked lysinoalanine, N(epsilon)-fructoselysine and N(epsilon)-carboxymethyllysine in rats. *Mol Nutr Food Res* **50**: 833-841
- Soriani M, Pietraforte D, Minetti M (1994) Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys* **312**: 180-188
- Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA (2008) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes* **57**: 2461-2469

-
- Soulis-Liparota T, Cooper ME, Dunlop M, Jerums G (1995) The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia* **38**: 387-394
- Stettler N, Stallings VA, Troxel AB, Zhao J, Schinnar R, Nelson SE, Ziegler EE, Strom BL (2005) Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation* **111**: 1897-1903
- Stitt AW, He C, Friedman S, Scher L, Rossi P, Ong L, Founds H, Li YM, Bucala R, Vlassara H (1997) Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. *Mol Med* **3**: 617-627
- Stocker C, O'Dowd J, Morton NM, Wargent E, Sennitt MV, Hislop D, Glund S, Seckl JR, Arch JR, Cawthorne MA (2004) Modulation of susceptibility to weight gain and insulin resistance in low birthweight rats by treatment of their mothers with leptin during pregnancy and lactation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**: 129-136
- Street ME, Seghini P, Fieni S, Ziveri MA, Volta C, Martorana D, Viani I, Gramellini D, Bernasconi S (2006) Changes in interleukin-6 and IGF system and their relationships in placenta and cord blood in newborns with fetal growth restriction compared with controls. *Eur J Endocrinol* **155**: 567-574
- Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ, Holness MJ (2001) Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *Eur J Endocrinol* **145**: 529-539
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* **405**: 354-360
- Tessier FJ, & Birlouez-Aragon, I. (2012) Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. *Amino Acids* **42(4)**: 1119–1131.
- Thamotharan M, Shin BC, Suddirikku DT, Thamotharan S, Garg M, Devaskar SU (2005) GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**: E935-947
- Thompson LP, Al-Hasan Y (2012) Impact of oxidative stress in fetal programming. *J Pregnancy* **2012**: 582748
- Thornalley P (1999) The clinical significance of glycation. *Clinical laboratory* **45**: 263-273
- Thornalley PJ, Rabbani N (2014) Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry--a user's perspective. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 818-829
- Uribarri J, Cai W, Ramdas M, Goodman S, Pyzik R, Chen X, Zhu L, Striker GE, Vlassara H (2011) Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care* **34**: 1610-1616

Uribarri J, Peppas M, Cai W, Goldberg T, Lu M, Baliga S, Vassalotti JA, Vlassara H (2003) Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *Am J Kidney Dis* **42**: 532-538

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H (2010a) Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* **110**: 911-916.e912

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H (2010b) Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* **110**: 911-916 e912

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM (1996) Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* **14**: 95-97

Valdez R, Athens MA, Thompson GH, Bradshaw BS, Stern MP (1994) Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* **37**: 624-631

Van Assche FA, De Prins F, Aerts L, Verjans M (1977) The endocrine pancreas in small-for-dates infants. *Br J Obstet Gynaecol* **84**: 751-753

Van Puyvelde K MT, Njemini R, Beyer I, Bautmans I. (2014) Effect of advanced glycation end product intake on inflammation and aging: a systematic review. *Nutr Rev* **72(10)**: 638-650

Veenendaal MV, Painter RC, de Rooij SR, Bossuyt PM, van der Post JA, Gluckman PD, Hanson MA, Roseboom TJ (2013) Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *Bjog* **120**: 548-553

Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J (2001) Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* **59**: 238-245

Vermeil G, Arsan A, Du Fraysseix M, Dartois A-M (2003) *Alimentation de l'enfant de la naissance à 3 ans*: Wolters Kluwer France.

Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E83-87

Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M (2008) The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology* **149**: 1906-1913

Viegas OA, Scott PH, Cole TJ, Eaton P, Needham PG, Wharton BA (1982) Dietary protein energy supplementation of pregnant Asian mothers at Sorrento, Birmingham. II: Selective during third trimester only. *Br Med J (Clin Res Ed)* **285**: 592-595

Vlassara H, Brownlee M, Cerami A (1985) High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 5588-5592

Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppas M, Rayfield EJ (2002) Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15596-15601

Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, Zhu L, Neade T, Beeri M, Silverman JM, Ferrucci L, Tansman L, Striker GE, Uribarri J (2009) Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 4483-4491

Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R (1992) Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 12043-12047

Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M (1994) Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 11704-11708

Vlassara H, Uribarri J (2014) Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Current diabetes reports* **14**: 453

Voreades N, Kozil A, Weir TL (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Front Microbiol* **5**: 494

Vuguin P, Raab E, Liu B, Barzilai N, Simmons R (2004) Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation. *Diabetes* **53**: 2617-2622

Wang H, Jenner AM, Lee CY, Shui G, Tang SY, Whiteman M, Wenk MR, Halliwell B (2007) The identification of antioxidants in dark soy sauce. *Free Radic Res* **41**: 479-488

Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Bohm M, Nickenig G (2004) Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* **94**: 534-541

Wautier MP, Tessier FJ, Wautier JL (2014) [Advanced glycation end products: A risk factor for human health]. *Ann Pharm Fr* **72**: 400-408

Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, Jenkins DG, Stein G, Schmidt AM, Yan SF (2006) RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis* **185**: 70-77

Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Rong LL, Moser B, Markowitz GS, Stein G, Bierhaus A, Liliensiek B, Arnold B, Nawroth PP, Stern DM, D'Agati VD, Schmidt AM (2003) RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* **162**: 1123-1137

WHO. (2012) No health without research. Geneva.

WHO (2014) Preterm birth.

Wilkins BH (1992) Renal function in sick very low birthweight infants: 2. Urea and creatinine excretion. *Arch Dis Child* **67**: 1146-1153

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44**: 275-295

Wilson MR, Hughes SJ (1997) The effect of maternal protein deficiency during pregnancy and lactation on glucose tolerance and pancreatic islet function in adult rat offspring. *J Endocrinol* **154**: 177-185

Wintour EM, Moritz KM, Johnson K, Ricardo S, Samuel CS, Dodic M (2003) Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J Physiol* **549**: 929-935

Wolffe AP, Matzke MA (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science* **286**: 481-486

Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD (1996) Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* **40**: 438-443

Woodmansey EJ (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* **102**: 1178-1186

Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R (2001) Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* **49**: 460-467

Wu G, Bazer FW, Wallace JM, Spencer TE (2006) Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J Anim Sci* **84**: 2316-2337

Yajnik CS (2004) Obesity epidemic in India: intrauterine origins? *Proc Nutr Soc* **63**: 387-396

Yang Z, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran M, Vlassara H (1991) Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med* **174**: 515-524

Yoshida N, Okumura K, Aso Y (2005) High serum pentosidine concentrations are associated with increased arterial stiffness and thickness in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* **54**: 345-350

Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S (2005) Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* **1**: 371-378

Zerfu TA, Ayele HT (2013) Micronutrients and pregnancy; effect of supplementation on pregnancy and pregnancy outcomes: a systematic review. *Nutr J* **12**: 20

Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia RA (2007) Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microb Ecol* **54**: 203-216

Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3854-3859

PARTIE VII : Annexe

Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming

Paulo C. F. Mathias · Ghada Elmhiri · Júlio C. de Oliveira ·
Carine Delayre-Orthez · Luiz F. Barella · Laize P. Tófolo ·
Gabriel S. Fabricio · Abalo Chango · Latifa Abdennebi-Najar

Received: 8 October 2013 / Accepted: 12 January 2014 / Published online: 28 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Nutrition and lifestyle, particularly over-nutrition and lack of exercise, promote the progression and pathogenesis of obesity and metabolic diseases. Nutrition is likely the most important environmental factor that modulates the expression of genes involved in metabolic pathways and a variety of phenotypes associated with obesity and diabetes. During pregnancy, diet is a major factor that influences the organ developmental plasticity of the foetus. Experimental evidence shows that nutritional factors, including energy, fatty acids, protein, micronutrients, and folate, affect various aspects of metabolic programming. Different epigenetic mechanisms that are elicited by bioactive factors in early critical developmental ages affect the susceptibility to several diseases in adulthood. The beneficial effects promoted by exercise training are well recognised, and physical exercise may be considered one of the more prominent non-pharmacological tools that can be used to attenuate metabolic programming and to consequently ameliorate the illness provoked by metabolic diseases and reduce the prevalence of obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases. Literature on

the different outcomes of unbalanced diets and the beneficial effects of some bioactive molecules during gestation and lactation on the metabolic health of offspring, as well as the potential mechanisms underlying these effects, was reviewed. The importance of the combined effects of functional nutrition and exercise as reprogramming tools of metabolic programming is discussed in depth. Finally, this review provides recommendations to healthcare providers that may aid in the control of early programming in an attempt to optimise the health of the mother and child.

Keywords Perinatal life · Metabolic programming · Nutrition · Metabolic syndrome · Epigenetic modification · Physical activity

Introduction

The greatest burden of ill health for adults in most societies is related to type 2 diabetes and obesity [1, 2]. These diseases are caused by lifestyle choices in which poor diet and relatively low levels of physical activity play a major role [3, 4]. Several epidemiological studies have revealed that exposure to an unfavourable environment early in life is associated with a significantly increased risk of later disease; this phenomenon is termed *early life programming*. The term “programming” defines a perturbation at (a) critical period(s) of development that cause permanent lifelong alteration(s) with “irreversible” consequences. Key epidemiological work connecting poor foetal growth and subsequent development of impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, as well as hypertension and cardiovascular disease, was presented by Hales and Barker, who developed the “foetal origin hypothesis” [5]. These authors also provided the initial answer to the

Paulo C. F. Mathias and Ghada Elmhiri both have contributed equally to the manuscript.

P. C. F. Mathias · J. C. de Oliveira · L. F. Barella ·
L. P. Tófolo · G. S. Fabricio
Laboratory of Secretion Cell Biology, Department of
Biotechnology, Genetics and Cell Biology, State University of
Maringá, Maringá, PR, Brazil

G. Elmhiri · C. Delayre-Orthez · A. Chango ·
L. Abdennebi-Najar (✉)
Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, EGEAL-UP
2012.10.120., 19 Rue Pierre Wagué, 60026 Beauvais Cedex,
France
e-mail: latifa.najar@lasalle-beauvais.fr

question of how low birth weight and adult chronic diseases are associated. These studies proposed that foetuses adapt to an impaired supply of nutrients by changing their metabolism. The architecture and function of the brain and peripheral tissues are also changed. These alterations are prepared to always adapt to restricted nutrition. After delivery of the foetus, once nutrition becomes abundant, metabolic homeostasis is disrupted, which facilitates the onset of metabolic diseases later in life, as described by the “thrifty phenotype hypothesis” [5, 6]. Such studies provide the foundation and framework for the relatively new field of study on the developmental origins of health and disease (DOHaD). Although great strides have been made in identifying the putative concepts and mechanisms that relate specific exposures early in life to the risk of developing chronic diseases in adulthood, the precise mechanisms remain obscure.

The spectrum of such post-natal consequences is growing and is more recently thought to include disorders of the immune system, brain function, and cancer, to name a few. Moreover, a growing body of evidence highlights the importance of maternal body weight, nutrition, and physical activity and how these features can imprint, from preconception through lactation, organ systems and metabolic pathways to allow the emergence of the homeostasis of the progeny.

A growing body of evidence supports the hypothesis that epigenetic changes, such as DNA methylation and histone modifications, both of which involve chromatin remodelling, contribute to developmental plasticity, and can be a determinant of the foetal programming phenomena [7–10]. In this review, the role of the maternal diet and physical activity is highlighted regarding their potential effects on metabolism and cell activity. Their potential role on developmental plasticity and how both of these factors

can help prevent obesity and type 2 diabetes were examined.

Maternal nutrition and foetal programming

It is well known that nutrition is a key environmental condition that drives natural selection and developmental plasticity [11, 12]. The early work of Barker and colleagues highlights the role of foetal nutrition as a primary factor involved in the developmental origins of adult disease [13]. A disproportionate size at the birth of a newborn due to an adverse intrauterine environment is correlated well with an increased risk of adult-onset ill health outcomes. Similarly, it has also been reported by several experimental studies using animal models that maternal exposure to an imbalanced diet during gestation can independently exert long-term effects on several central and peripheral systems in the offspring, such as placental and β -cell dysfunction (Fig. 1). Using the large mammalian naturally occurring intrauterine growth restricted (IUGR) pig model, we demonstrated that, as in human babies, piglets with a low birth weight exhibit a permanent alteration in their body growth and development [14, 15] and present defects in the maturation of several organ systems, mainly the immune system, pancreatic system, and intestinal system [14, 15]. In rodents, maternal food restriction of up to 50 % during the last week of pregnancy causes an impairment in the offspring’s pancreatic β -cell development [11]. In rats, moderate nutritional restriction (30 % of normal ad libitum food intake) during the first 18 days of pregnancy resulted in IUGR offspring that reached the body weight of controls by post-natal day 20 and was associated with hyperinsulinaemia, hyperphagia, obesity, and hypertension. These abnormalities increase with age and are most pronounced

Fig. 1 Programming of metabolic syndrome. Several stressful insults during pregnancy may trigger alterations in the foetal environment that modulate the development of different organs and/or tissues to induce metabolic programming

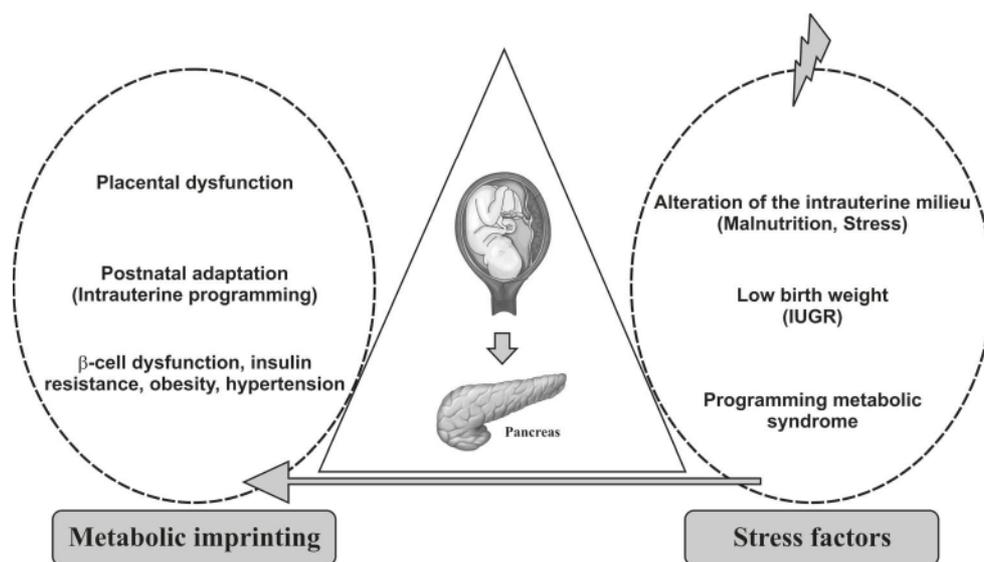
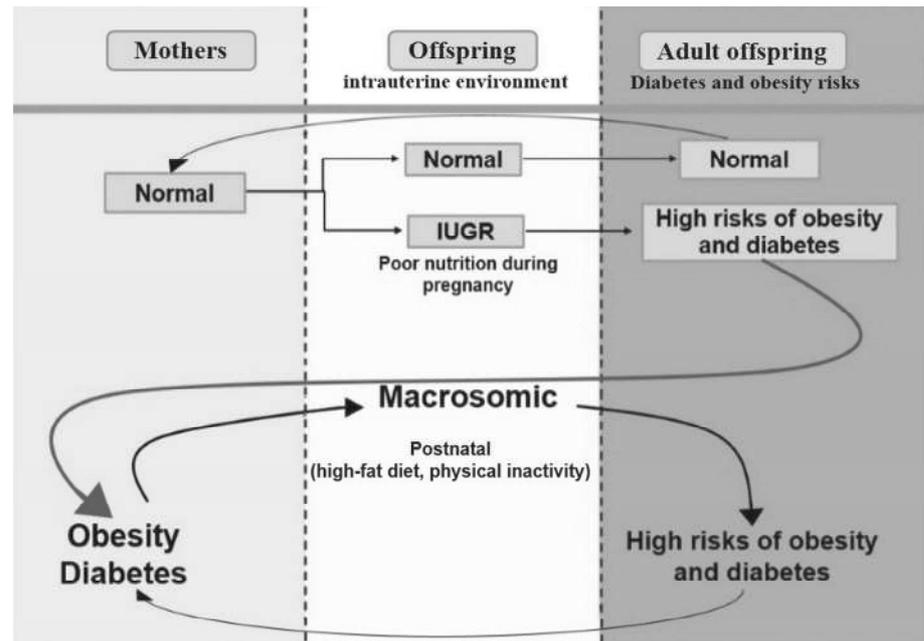


Fig. 2 Risks of diabetes and obesity in intrauterine growth-retarded and macrosomic infants. Effect of stress factors, such as post-natal high-fat diet and physical inactivity, that affect the adult health status of the offspring



in male offspring [16]. Although the potential mechanisms remain unclear, inflammatory deregulation may be one explanation. Adipose tissue inflammation is known to potentiate insulin resistance and obesity-induced metabolic disease [17–19]. Perturbations in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis, including glucocorticoid action via maternal nutrient restriction, are also associated with obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in the offspring [20, 21].

A maternal low-protein (MLP) diet during pregnancy and lactation is one of the most extensively used rodent models of nutritional programming [22]. The offspring of MLP demonstrates both central and peripheral insulin resistance and alterations in insulin activity [23]. Using an early life programmed rat model, it was shown that the expression profile of adipose tissue genes, including genes involved in metabolism and inflammation of the offspring from MLP, is altered [24].

The relationship between the prenatal nutritional status and metabolic diseases is shaped like a U because the risk increases at both ends of the birth weight range under conditions of poor nutrition and excessive dietary intake [25]. According to these studies, the risk doubles for children with macrosomia. In addition, the risk is nearly double for those born to obese mothers and increases by 1.5-fold for those born to mothers with diabetes [25]. This relationship was evidenced in a population of Pima Indians, who exhibit the world's highest prevalence and incidence of type 2 diabetes [26].

The effects of diabetic pregnancy can be considered a vicious cycle. The infant of a woman with diabetes has a high risk of becoming obese and developing type 2

diabetes at a young age. A young woman whose mother had diabetes during pregnancy has a risk of perpetuating the cycle by becoming obese and developing type 2 diabetes before or during her childbearing years [27], which highlights how the environment can decisively affect the offspring phenotype later in life. A post-natal high-fat diet and lack of exercise are some of the major contributing factors in the maintenance of this vicious cycle (Fig. 2).

Micronutrients

Although micronutrient deficiencies are known causes of several well-characterised diseases [28, 29], the role of micronutrients in the foetal origins of adult disease, particularly adult metabolic diseases, is not clearly defined. In addition, the existing results are often conflicting, and the significance is always ambiguous [30]. One of two randomised controlled trials found that daily multiple micronutrient supplementation in pregnant women resulted in a slightly lower blood pressure in the offspring at 2.5 years of age [31], whereas the other study found that maternal multiple micronutrient supplementation exerted no effect on the blood pressure among 6- to 8-year-old offspring [32]. Data on the effect of maternal micronutrient supplementation and obesity are very scarce and controversial [33, 34]. A maternal diet restricted in iron, zinc, calcium, and magnesium, either individually or in combination, was found to result in an increased percentage of body fat and exerted some varying effects on insulin resistance and blood pressure elevation in the offspring [35, 36, 37, 38]. Studies on maternal dietary zinc restriction in rats indicated that zinc deficiency during intrauterine and post-natal

growth could induce elevations in blood pressure and renal lesions in adulthood [39–41].

Regarding vitamins, a study in both male and female rats showed that restricted vitamin intake during pregnancy increased the phenotypic expression of obesity and the components of metabolic syndrome when the rats were fed an obesogenic diet [42, 43].

Folic acid is a B vitamin that is extensively documented due to its metabolic importance during pregnancy, but it is also important for its direct link to the epigenetic process [44]. It is an essential element for the health of the mother and child because DNA structural and function changes are associated with folic acid [45]. All women of childbearing age, especially those who are planning to become pregnant, should consume folic acid daily at a dose ranging between 0.4 and 0.8 mg to prevent neural tube defects and other adverse perinatal outcomes [45, 46]. Supplementation with folic acid decreases the risk of preterm delivery by 70 % in the 20- to 28-week period of gestation and by 50 % during the 28- to 32-week period.

The existing mechanistic studies argue that micronutrients can act as antioxidant agents and/or are considered components of the antioxidant system [47, 48]. Some of these act as potential modulators of enzyme activity, i.e., a maternal dietary restriction of copper, zinc, and vitamin E in mice reduces the activity level of placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, which is an enzyme that protects the foetus from overexposure to maternal glucocorticoids [49].

Carbohydrates

Regarding the effect of a high-sugar diet, a study in rats demonstrated that a high-fructose diet for 2 weeks resulted in increases in the systolic blood pressure and the plasma insulin and triglyceride concentrations compared to rats fed with normal chow [50]. Male offspring from dams fed either a standard or a high-sugar diet (70 % calories as sucrose throughout gestation and lactation) and then fed a high-sugar diet until the age of 20 weeks displayed high adiposity, increases in the triglyceride liver content, and high low-density lipoprotein (LDL) cholesterol concentrations [51]. A substantial increase in the insulin sensitivity of skeletal muscle and high concentrations of adiponectin in the offspring of sucrose-fed dams compared with the offspring of standard diet-fed dams is a potential mechanism underlying the differences between these two groups. However, triglycerides, free fatty acids, overall glucose tolerance, and the insulin sensitivity of adipose tissue were comparable between both groups. Interestingly, data obtained from the Camden study of adolescent pregnancy indicated that high sugar consumption was associated with an increased risk of delivering infants that were small for

their gestational age [52]. Moreover, high consumption of sugar-sweetened beverages is associated with an increase in body weight gain and type 2 diabetes in females, likely via the provision of large amounts of rapidly absorbable sugars [53]. Nevertheless, studies on the effect of high sugar consumption during pregnancy on offspring diabetes and obesity development are scarce. Moreover, it is important to determine how the different diet components interact when consumed and how they may be involved in the initiation and progression of chronic disease and metabolic programming. Despite the benefit of a low-carbohydrate diet, its potential effect on programming is unknown. This is a fair question in a dietetic risk-preventative and therapeutic context during pregnancy and in an under-nutrition context. A low glycaemic index maternal diet has been associated with measurable benefits to the offspring [54], which emphasises the importance of a balanced maternal diet, particularly in terms of carbohydrate quality during pregnancy and lactation, for the prevention of diet-induced adiposity and associated metabolic disruptions in the offspring. Recently, Srinivasan et al. [55] showed that neonatal rats that were reared on a high-carbohydrate milk formula developed chronic hyperinsulinaemia and adult-onset obesity due to the programming of islets and hypothalamic energy circuitry. Rats that received a restricted caloric diet from weaning to 140 days of age were unable to permanently overcome their programmed predisposition for a hypersecretory islet capacity and a hypothalamic hyperphagic response. These results argue the importance of the metabolic window during which a high-carbohydrate diet can have a long-lasting effect on offspring health. In addition, further research is required on the effect of a low-carbohydrate diet or diets with a wide range of carbohydrate contents to define the optimal range for a good pregnancy outcome without risk to the mother or babies.

Targeting metabolic diseases and the epigenome: effect of dietary components

Epigenetics is defined as heritable changes in gene expression that are not due to any alteration in the primary DNA sequence. Epigenetic mechanisms include DNA methylation, histone modification, and regulation by non-coding RNAs. Epigenetics control the way in which the genome interacts with and responds to the environment and even potentially the way the genome can influence its own environment via its effects on behaviour [2]. As previously indicated, the quality of maternal nutrition during pregnancy can permanently affect the phenotype of the offspring via a direct physiological interaction and results in post-natal perinatal outcomes in the offspring. However,

the profound benefit of most supplements remains inconclusive. Research studies have shown that calcium supplements decreased the risk of preeclampsia [56]. A low glycaemic Mediterranean-type diet decreases preterm birth and decreases the risk of gestational diabetes [57–59]. A prospective study of 797 rural Indian women, which focused on macronutrient intakes, dietary quality, and micronutrient status, showed that birth size was positively associated with the consumption of milk during the 18 week of gestation and the consumption of green leafy vegetables and fruits during the 28 week of gestation [60]. Strong associations with folate status and the micronutrient composition of food suggest that micronutrients may be important limiting factors for foetal growth in the studied undernourished community [60]. In addition to its major activity on bone health, it has been well reported that vitamin D also plays a pivotal role in the control of glycaemia and immune actions.

Regarding nutrition, some micronutrients, particularly B vitamins (B12, B6, B2) but also choline, betaine, or methionine, are known to affect early epigenetic status [61]. Although the role of folate in metabolic diseases and insulin resistance is a subject of debate, maternal nutrition studies have highlighted that the maternal erythrocyte folate [46] concentration at the 28 week of gestation is associated with high adiposity and insulin resistance in 6-year-old children [62]. Conversely, a study in England found that the maternal folate intake at the 18 or 32 week of gestation is not associated with any measures of body composition in 9-year-old children [63]. Experimental and epidemiological studies have also shown that folate deficiency results in decreased levels of S-adenosyl-methionine (AdoMet) and genomic DNA hypomethylation. Decreased DNA-cytosine methylation is an event of great importance in the regulation of gene expression. In addition, a decrease in the methylation of guanidinoacetic acid is needed for creatinine synthesis. DNA-cytosine methylation is a well-documented epigenetic process [64]. DNA methyltransferases (DNMTs) are the enzymes responsible for the methyl group transfer from AdoMet to cytosine in CpG sequences. In an epigenetic context, it has been shown that nuclear lysine-specific demethylase 1 (LSD1) in 167 HeLa cells is a folate-binding protein [65, 66]. LSD1 is a flavin-containing enzyme that removes the methyl groups from lysines 4 and 9 of histone 3 and generates formaldehyde from the methyl group. These studies found that the binding of the natural pentaglutamate form of THF exhibited the highest affinity ($K_d = 2.8 \mu\text{M}$) to LSD1. Moreover, folate participates in the enzymatic demethylation of histones, which provides a new perspective of the role of folate in the epigenetic control of gene expression at the histone level. AdoMet is involved in more than 100 reactions, and at least 80 AdoMet-dependent enzymes have

been identified [67]. Creatinine is one of the major molecules formed in this pathway. Higher levels of blood homocysteine, AdoMet, and creatinine were observed in males compared with females and are associated with the need for increased muscle activity in males. Because these metabolites reflect more intense exercise and muscle activities, their role in the physical activity of pregnant women in connection with folate status requires further investigation. It is also relevant in the context of exercise and metabolic programming in pregnant women. Understanding the effect of the transmethylation reactions of the one-carbon metabolic pathway, including creatinine synthesis and DNA and histone methylation, in pregnant women and early in life may provide insights on the role of folate and perhaps other B vitamins as modulators of infant and child metabolic programming.

Vitamin D has been reported to target histone modifications by recruiting histone acetylases. According to these data, a diet rich in omega-3 fatty acids, adequate calcium, vitamin D levels obtained via sun exposure or supplements, and the natural compounds that regulate the epigenome are important components that affect the health of both the mother and child and may have large implications in the prevention of many disorders later in life. Natural compounds, such as resveratrol or other bioactives, activate DNMT, histone acetylases, the deacetylase sirtuin, and may regulate oncogenic and tumour suppressor microRNAs [68–70].

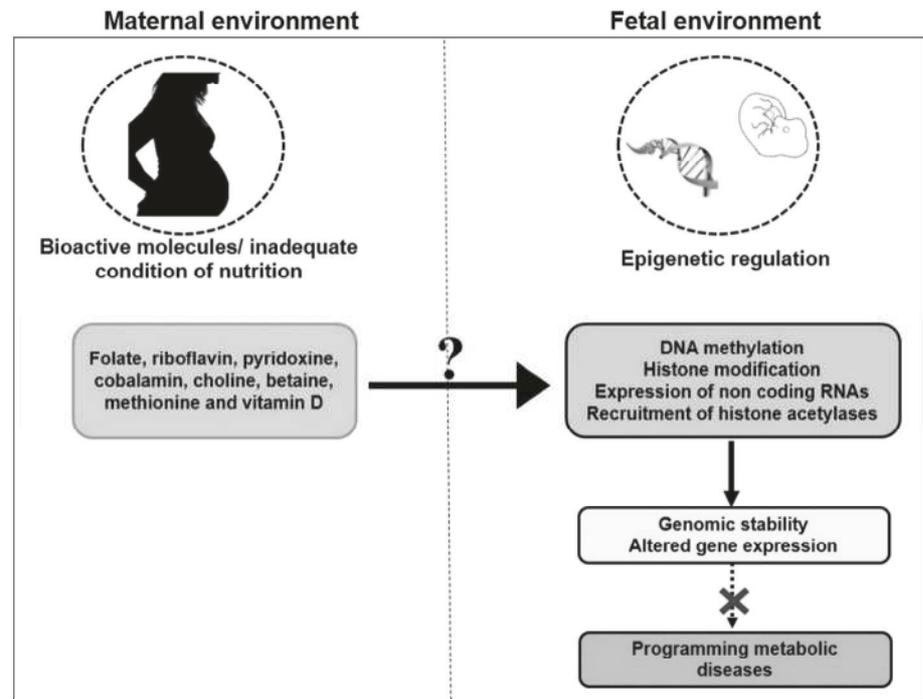
Currently, more studies are needed to assess the precise role of natural bioactive molecules in epigenetic regulation during pregnancy and their short- and long-term beneficial effects in offspring (Fig. 3).

Regarding carbohydrates, there are a limited number of studies linking dietary carbohydrates and epigenetics, although a large number of existing studies have focused on high glucose diets. In mothers with high glucose concentrations in blood, methylation occurs in the placental DNA locus, including the adiponectin gene locus and glucose transporter genes locus [71].

Exercise training and metabolism

Simple body movements induce many changes in metabolism and in all organism functions and thus exert a physiological effect that results in higher energy consumption compared to that required when the individual is at rest. Muscles are required to displace the body. To perform a movement, muscles have to impose contractions that consume energy. Energy stores, such as adenosine 5'-triphosphate (ATP), phosphocreatine, glycogen/glucose, and lipids/free fatty acids, may be mobilised to the muscle according to the time and duration of activity [72–74]. To

Fig. 3 Targeting epigenetic modifications using bioactive molecules during pregnancy. Promising tools against metabolic malprogramming. Functional food may affect epigenetic changes by inducing physiological functional impairment or improving the disruption induced during the developmental stages of life. It is possible that some pathways may be involved in the DNA remodelling required to revert the epigenetic changes, but the mechanism through which this occurs remains to be elucidated



run a short distance (100 metres) as fast as possible, runners use glucose reserves and burn them under anaerobic conditions [75, 76]. In contrast, marathoners, who have to cover long distances (20,000 m), use fat reserves as their major source of energy to move their muscles, i.e., marathoners use aerobic metabolism, which consumes oxygen to efficiently produce ATP over long periods of time [77].

It has been shown that physical exercise using approximately 65 % of VO_2 max mobilises a large amount of fatty acids, which allows the reduction in lipid stores and consequently a loss in body weight [78]. The autonomic nervous system (ANS) is also involved in the fatty acid mobilisation induced by physical exercise. Many body functions, such as heart activity, are stimulated by the sympathetic nervous system, which functions to increase blood fluxes, particularly near the adipose tissue region, to ensure muscle nutrition during exercise [79, 80]. It has been shown that sympathetic activity is enhanced during physical exercise and that fat mobilisation is dependent on the noradrenaline release from adrenergic ends in adipocytes. Moreover, the adrenal medulla cell releases catecholamines, mostly adrenaline, into the blood stream, which stimulates the lipolysis pathway [81, 82]. In mice, our laboratory has demonstrated that low-intensity free-swimming training, which consumes 60 % of VO_2 max, induces a decrease in the fat tissue stores that are related to the activation of the sympathoadrenal axis [83, 84]. In contrast, there is no evidence that parasympathetic activity

is directly involved in the exercise-induced fat mobilisation of muscle or fat tissues.

Other important conditions of exercise training are the frequency and duration, which can influence the effectiveness of fat mobilisation. Although this question is still debated, it has been demonstrated that an increase in the frequency of physical exercise does not significantly increase fat mobilisation [85, 86]; however, as demonstrated by our data and those of others, a low exercise frequency is able to induce as many beneficial effects on metabolism as high-frequency exercise training [83, 84, 87–89].

The latency of exercise training is important for stimulating the metabolic degradation of lipids, even at rest. It has been observed that the halting of exercise training results in an increase in fat accumulation with a high regain of body weight [90]. The duration of exercise training sessions also contributes to lipid mobilisation via adaptations that increase fat oxidation [85, 86]. As was recently shown, a short daily bout of exercise training exerts health benefits. Voluntary wheel running improved body composition in young healthy adult mice, and swimming training improved the body composition of pre-diabetic obese mice [91, 92].

Importantly, there is no formula to determine the optimal intensity, frequency, and/or latency of aerobic exercise training to maintain, or even lose, body weight due to each individual's peculiarities, such as anthropometric parameters, health conditions, and age, which are crucial to obtain health benefits with exercise training [93].

Exercise training for the treatment and/or prevention of metabolic programming

Exercise training induces changes in the blood nutrient and hormone levels and afferent neural impulses that influence brain activity, including hypothalamic functions, all of which are involved in the regulation of body weight and energy metabolism [94–96]. During perinatal life, exercise training may result in changes in the hypothalamus architecture and function to aid the imprint on metabolism, which is maintained even during adult life. In addition, exercise training during perinatal life may inhibit the metabolic programming established by insults early in life [97–99].

Vigorous physical activity (between 7 and 13 h per week) before pregnancy and light- to moderate-intensity physical activity (approximately 3–6 h) during pregnancy may reduce the risk of impaired glucose tolerance in pregnancy [100]. In fact, skeletal muscle contraction triggers glucose uptake and promotes increased insulin sensitivity, and more intense exercise exerts a stronger hypoglycaemic effect [101]. Several studies have also shown the beneficial effects of regular physical exercise on the growth of malnourished children [102] and rats [103], which indicates that physical exercise can positively affect nutritional recovery when it is performed during adolescence. Similarly, although there is still no consensus on the long-term effects of physical exercise [104] on metabolic syndrome, its benefits are evident in isolated diseases, such as obesity, type 2 diabetes mellitus, and hypertension [105, 106]. However, the acute effects of physical exercise on early under- or over-nourished subjects during pregnancy are important to determine the appropriate exercise prescription that can be used to improve the metabolic parameters associated with metabolic programming and to determinate the long-lasting effect of exercise on recovery after an uncontrolled foetal programming process.

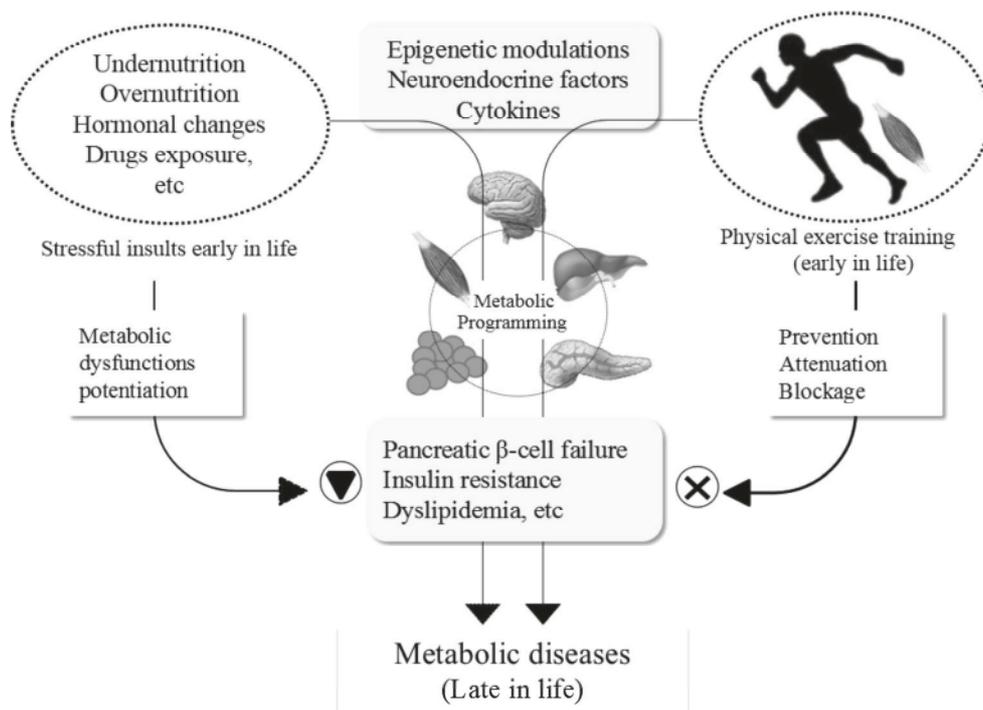
Using an obesity model programmed by neonatal treatment with monosodium L-glutamate (MSG), the subjection of MSG-obese mice to exercise training, such as free swimming, which is considered low intensity with less than 60 % VO_2max , at a low frequency for 70 days after weaning, which included the adolescence phase, showed a substantial reduction in the obesity development as the mouse reached adulthood. The trained mice also showed improvement in the tissue insulin sensitivity and blood glucose and insulin levels, among other metabolic disturbances caused by MSG treatment [83, 87]. In these studies, it was also observed that the interruption of exercise training before adult life and after adolescence did not affect the metabolic improvement observed during adulthood. In contrast, the mice programmed to obesity that were subjected to the same exercise training during their

adult life developed obesity without any metabolic improvement [87]. Recently, we demonstrated that adolescence is also a window that can induce metabolic programming later in life. The administration of a poor-protein diet to 30-day-old rats during a period of 30 days caused increased fat tissue accumulation, fasting hyperinsulinaemia, and tissue insulin resistance, among other hallmarks of metabolic syndrome, in 120-day-old adult rats [107], as well higher vulnerability to obesity induced by a high-fat diet (HFD) [108].

The reduction in body mass induced by exercise was associated with changes in innate immunity, particularly changes in the number of resident immune cells in the adipose tissue and the levels of cytokines/chemokines in serum [109]; however, the mechanisms remain unclear. A study performed by Kizaki and colleagues using a model of HFD-induced obesity showed that exercise contributed to a decrease in body weight associated with a decreased expression of pro-inflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). The expression of these pro-inflammatory cytokines was inversely correlated with the expression of ghrelin, which is a peptide that is also expressed in macrophages [110]. Similar data were obtained using rats programmed for obesity by HFD that were subjected to early post-weaning voluntary exercise [111]. In a non-obese rat model, long-term intense exercise, starting at the beginning of adolescence, induced a decrease in the levels of pro-inflammatory cytokines in adipose tissue, which suggests that exercise may have a protective effect against the development of obesity or metabolic syndrome [112]. Pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), are implicated in insulin-sensitive pathways. Sedentary IL-6 knockout (IL-6^{-/-}) mice and wild-type mice displayed HFD-induced insulin resistance. However, this resistance was blocked by exercise training in HFD wild-type mice but not in the IL-6^{-/-} mice, which suggested a protective effect of IL-6 against HFD-induced insulin resistance [113]. However, there are some conflicting statements in the literature that suggest that IL-6 may decrease [114, 115] or increase [116, 117] insulin sensitivity, although the molecular mechanisms are not yet completely understood, and further studies are required to better understand this pattern.

The functional effects of exercise training, as an important tool to prevent or at least attenuate the nutritional metabolic dysfunctions induced early in life by stressful factors, is one important issue that is currently being debated (Fig. 4). As previously reported, pregnant rats subjected to moderate-to-low-intensity physical training before and during gestation can attenuate the programmed metabolic malfunction effects of the offspring induced by protein-restricted lactating dams [118]. Thus, we propose a

Fig. 4 Exercise training as a non-pharmacological tool against metabolic syndrome. Exercise training has been found to be a key stimulatory factor for the attenuation or even prevention of metabolic dysfunction. Several factors, including epigenetic modulation, neuroendocrine factors, and cytokines, have been implicated in the health benefits achieved by chronic or acute exercise training deprogramming, before or during the metabolism malprogramming activity



potential mechanism that underlies some of the imprinted physiological effects/adaptations against the metabolic malprogramming due to the intrauterine food deprivation. It is possible that epigenetic changes are strongly involved in these physical training effects, which may be spread transgenerationally [8, 119].

Exercise elicits gene expression changes that trigger structural and metabolic adaptations in skeletal muscle. Coffey and Hawley have reported a high degree of plasticity in the skeletal muscle adaptive response to environmental stressors. This challenges the structural and metabolic demands of the tissue. Muscle contraction through physical exercise drives adaptive responses to improve metabolic efficiency, oxidative capacity, and contractile activity by altering gene expression profiles and protein levels [120]. Following their study, Barrès et al. 2012 [121] provided evidence that acute gene activation is associated with a dynamic change in DNA methylation in skeletal muscle and suggested that DNA hypomethylation is an early event in contraction-induced gene activation. Another recent study from Roönn et al., 2013 [122] described the genome-wide pattern of DNA methylation in human adipose tissue obtained from 23 healthy men, with a previously low level of physical activity, before and after 6 months of exercise intervention. They concluded that exercise induces genome-wide changes in DNA methylation in human adipose tissue, which potentially affects adipocyte metabolism.

A recent study has shown that histone deacetylase 4 (HDAC4) is downregulated in obese subjects, while its expression is induced in response to exercise. HDAC4 may

play an important role in modulating epigenetic mechanisms because histone deacetylase proteins regulate histone acetylation, which results in differential gene expression [123]. It was recently reported that epigenetic modulations of pro-inflammatory cytokines and learning brain areas are involved in the health benefits exerted by chronic moderate exercise training action, even in adulthood [124–126]. Another recent study also clearly demonstrated the involvement of exercise on genome-wide modulation of DNA methylation. In adult humans, after 6 months of exercise intervention, the study found that exercised subjects showed differential mRNA expression in 1/3 of the genes where the DNA methylation was changed, including HDAC4 [127]. Indeed, exercise modulates adaptations, and many of them occur via epigenetic mechanisms, i.e., DNA methylation or histone acetylation/deacetylation [128]. Nevertheless, the precise pathway through which this “deprogramming” effect may occur is not yet known, and it is important to note that the effect of regular exercise during pregnancy will lead to either positive or negative health outcomes (extensively reviewed by [129]).

In addition to the experimental data, epidemiological data have shown that exercise training is also an important tool to prevent metabolic diseases [130]. As previously reported, exercise training in humans critically influences the cerebral blood flow and metabolism via an increase in the sympathetic tonus, which increases brain-derived neurotrophic factors [131] that may promote the improvement of metabolic dysfunctions observed in obese and diabetic patients [132, 133]. Other factors, such as

pro-inflammatory cytokines (adipokines and/or myokines) and several genes that encode transcription factors, are involved in physical exercise [116, 134] and are implicated in the insulin sensitivity pathways and energy expenditure.

Another important finding regarding exercise is that the skeletal muscle produces a polypeptide hormone known as irisin, which is an important molecule that confers fitness and metabolic benefits. The administration of irisin reduces body weight and insulin resistance in rats fed a HFD [134]. Chronic exercise training promotes irisin release into the blood flow, which binds to specific receptors (not yet known) in the membranes of white adipose tissue cells to activate energy expenditure. Irisin stimulates changes in the structural and functional composition of white adipose tissue to brown adipose tissue [134]. Irisin is generated from fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5), the expression of which is increased in skeletal muscle during exercise training. Furthermore, irisin promotes the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) in white adipose tissue, which activates thermogenic machinery [135].

Thus, the beneficial effects promoted by exercise training-induced irisin release, among several other expressed molecules, make physical training one of the more prominent non-pharmacological tools that can be used to attenuate the metabolic programming effects later in life and to consequently ameliorate illness provoked by metabolic diseases and to reduce the prevalence of obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases.

Conclusions

It is now widely accepted that specific chronic diseases of adulthood may have their origins during development. In fact, there are solid arguments that the risk of obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular dysfunctions, which are metabolic diseases in adulthood, is subject to programming during perinatal life. In this review, we provide some evidence that diet and physical exercise are some of the major components that determine the short- and long-term health statuses of the mother and offspring and should be considered preventive tools against the development of metabolic diseases. We also provide evidence that adequate vitamin, micronutrient, and bioactive molecule supplies are crucial during pregnancy and lactation to ensure normal foetal growth and development and to preserve infant health later in life. A sizeable number of experimental studies, predominantly in rats, highlight the effects of some bioactive molecules on epigenetic modifications and indicate that it might be possible to prevent metabolic programming and the risk of adult diseases later in life. However, further studies on the effect of natural

compounds on the epigenome and how these can reverse metabolic programming are required before any precise recommendations can be made to pregnant women. Healthcare providers need to precisely advise pregnant women to eat adequate diets and exercise based on the individual needs and health statuses of the mother and infant. New knowledge in this field and a more complete understanding of the role of diet, bioactive molecules, and physical exercise according to the individual health status on the prevention of metabolic syndrome can greatly aid in the elimination of the metabolic pandemic, which could bring hope, save lives, and improve the quality of life in later generations.

Acknowledgments The authors thank the financial support of LaSalle Beauvais Institute, which permitted the visit of Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias in the research unit “Expression des Gènes et Régulation Epigénétique par l’Aliment” (EGEAL), who contributed to the preparation of this manuscript.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Colditz GA et al (1995) Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 122(7):481–486
2. Haggarty P (2012) Nutrition and the epigenome. *Prog Mol Biol Transl Sci* 108:427–446
3. Hu FB et al (2003) Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA* 289(14):1785–1791
4. Hu FB et al (2001) Physical activity and television watching in relation to risk for type 2 diabetes mellitus in men. *Arch Intern Med* 161(12):1542–1548
5. Barker DJ (1999) Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med* 31(Suppl 1):3–6
6. Hales CN, Barker DJ (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60:5–20
7. Heijmans BT et al (2008) Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(44):17046–17049
8. Burdge GC et al (2007) Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 97(6):1036–1046
9. Waterland RA, Michels KB (2007) Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr* 27:363–388
10. Szyf M (2012) The early-life social environment and DNA methylation. *Clin Genet* 81(4):341–349
11. Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE (2006) Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 88(3):234–243
12. Eberle C, Ament C (2012) Diabetic and metabolic programming: mechanisms altering the intrauterine milieu. *ISRN Pediatr* 2012:975685
13. Barker DJ, Osmond C (1986) Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1(8489):1077–1081
14. Attig L et al (2008) Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-weight piglets and effects of leptin

- supplementation on neonatal growth and development. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(5):E1117–E1125
15. Attig L et al (2013) Postnatal leptin promotes organ maturation and development in IUGR piglets. *PLoS One* 8(5):e64616
 16. Ozaki T et al (2001) Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* 530(Pt 1):141–152
 17. Odegaard JI, Chawla A (2013) The immune system as a sensor of the metabolic state. *Immunity* 38(4):644–654
 18. Sharkey D et al (2009) Maternal nutrient restriction during pregnancy differentially alters the unfolded protein response in adipose and renal tissue of obese juvenile offspring. *FASEB J* 23(5):1314–1324
 19. Sharkey D et al (2009) Maternal nutrient restriction during early fetal kidney development attenuates the renal innate inflammatory response in obese young adult offspring. *Am J Physiol Renal Physiol* 297(5):F1199–F1207
 20. Gnanalingham MG et al (2005) Differential effects of leptin administration on the abundance of UCP2 and glucocorticoid action during neonatal development. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(6):E1093–E1100
 21. Gnanalingham MG et al (2005) Tissue-specific effects of leptin administration on the abundance of mitochondrial proteins during neonatal development. *J Endocrinol* 187(1):81–88
 22. Snoeck A et al (1990) Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate* 57(2):107–118
 23. Cottrell EC, Ozanne SE (2007) Developmental programming of energy balance and the metabolic syndrome. *Proc Nutr Soc* 66(2):198–206
 24. Guan H et al (2005) Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(4):E663–E673
 25. Boney CM et al (2005) Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115(3):e290–e296
 26. Pettitt DJ et al (1987) Obesity in offspring of diabetic Pima Indian women despite normal birth weight. *Diabetes Care* 10(1):76–80
 27. Dabelea D, Knowler WC, Pettitt DJ (2000) Effect of diabetes in pregnancy on offspring: follow-up research in the Pima Indians. *J Matern Fetal Med* 9(1):83–88
 28. Shenkin A (2006) Micronutrients in health and disease. *Postgrad Med J* 82(971):559–567
 29. Shenkin A (2006) The key role of micronutrients. *Clin Nutr* 25(1):1–13
 30. Garcia OP, Long KZ, Rosado JL (2009) Impact of micronutrient deficiencies on obesity. *Nutr Rev* 67(10):559–572
 31. Vaidya A et al (2008) Effects of antenatal multiple micronutrient supplementation on children's weight and size at 2 years of age in Nepal: follow-up of a double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 371(9611):492–499
 32. Stewart CP et al (2009) Antenatal micronutrient supplementation reduces metabolic syndrome in 6- to 8-year-old children in rural Nepal. *J Nutr* 139(8):1575–1581
 33. Fall CH et al (2003) Micronutrients and fetal growth. *J Nutr* 133(5 Suppl 2):1747S–1756S
 34. Rao KR, Padmavathi IJ, Raghunath M (2012) Maternal micronutrient restriction programs the body adiposity, adipocyte function and lipid metabolism in offspring: a review. *Rev Endocr Metab Disord* 13(2):103–108
 35. Padmavathi IJ et al (2009) Prenatal and perinatal zinc restriction: effects on body composition, glucose tolerance and insulin response in rat offspring. *Exp Physiol* 94(6):761–769
 36. Padmavathi IJ et al (2010) Chronic maternal dietary chromium restriction modulates visceral adiposity: probable underlying mechanisms. *Diabetes* 59(1):98–104
 37. Lewis RM et al (2002) Long-term programming of blood pressure by maternal dietary iron restriction in the rat. *Br J Nutr* 88(3):283–290
 38. Lewis RM et al (2001) Effects of maternal iron restriction in the rat on blood pressure, glucose tolerance, and serum lipids in the 3-month-old offspring. *Metab Clin Exp* 50(5):562–567
 39. Tomat A et al (2010) Exposure to zinc deficiency in fetal and postnatal life determines nitric oxide system activity and arterial blood pressure levels in adult rats. *Br J Nutr* 104(3):382–389
 40. Tomat AL et al (2008) Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(2):R543–R549
 41. Tomat AL, Costa MDL, Arranz CT (2011) Zinc restriction during different periods of life: influence in renal and cardiovascular diseases. *Nutrition* 27(4):392–398
 42. Kumar KA et al (2013) Maternal dietary folate and/or vitamin B12 restrictions alter body composition (adiposity) and lipid metabolism in Wistar rat offspring. *J Nutr Biochem* 24(1):25–31
 43. Venu L et al (2004) Maternal dietary vitamin restriction increases body fat content but not insulin resistance in WNIN rat offspring up to 6 months of age. *Diabetologia* 47(9):1493–1501
 44. Kim KC, Friso S, Choi SW (2009) DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem* 20(12):917–926
 45. Crider KS, Bailey LB, Berry RJ (2011) Folic acid food fortification—its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients* 3(3):370–384
 46. Chango A, Abdennebi-Najar L (2011) Folate metabolism pathway and *Plasmodium falciparum* malaria infection in pregnancy. *Nutr Rev* 69(1):34–40
 47. Christian P et al (2010) Prenatal micronutrient supplementation and intellectual and motor function in early school-aged children in Nepal. *JAMA J Am Med Assoc* 304(24):2716–2723
 48. Christian P, Stewart CP (2010) Maternal micronutrient deficiency, fetal development, and the risk of chronic disease. *J Nutr* 140(3):437–445
 49. Rosario JF, Gomez MP, Anbu P (2008) Does the maternal micronutrient deficiency (copper or zinc or vitamin E) modulate the expression of placental 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase-2 per se predispose offspring to insulin resistance and hypertension in later life? *Indian J Physiol Pharmacol* 52(4):355–365
 50. Hwang IS et al (1987) Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10(5):512–516
 51. Sedova L et al (2007) Sucrose feeding during pregnancy and lactation elicits distinct metabolic response in offspring of an inbred genetic model of metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(5):E1318–E1324
 52. Lenders CM et al (1997) Gestational age and infant size at birth are associated with dietary sugar intake among pregnant adolescents. *J Nutr* 127(6):1113–1117
 53. Schulze MB et al (2004) Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA J Am Med Assoc* 292(8):927–934
 54. Tzanetakou IP, Mikhailidis DP, Perrea DN (2011) Nutrition during pregnancy and the effect of carbohydrates on the offspring's metabolic profile. In search of the “perfect maternal diet”. *Open Cardiovasc Med J* 5:103–109
 55. Srinivasan M, Mahmood S, Patel MS (2013) Metabolic programming effects initiated in the suckling period predisposing for adult-onset obesity cannot be reversed by calorie restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304(5):E486–E494

56. Patrelli TS et al (2012) Calcium supplementation and prevention of preeclampsia: a meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25(12):2570–2574
57. Mikkelsen TB et al (2008) Association between a Mediterranean-type diet and risk of preterm birth among Danish women: a prospective cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87(3):325–330
58. Haugen M et al (2008) Mediterranean-type diet and risk of preterm birth among women in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa): a prospective cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87(3):319–324
59. Barger MK (2010) Maternal nutrition and perinatal outcomes. *J Midwifery Womens Health* 55(6):502–511
60. Rao S et al (2001) Intake of micronutrient-rich foods in rural Indian mothers is associated with the size of their babies at birth: Pune Maternal Nutrition Study. *J Nutr* 131(4):1217–1224
61. Dominguez-Salas P et al (2013) DNA methylation potential: dietary intake and blood concentrations of one-carbon metabolites and cofactors in rural African women. *Am J Clin Nutr* 97(6):1217–1227
62. Yajnik CS et al (2008) Vitamin B12 and folate concentrations during pregnancy and insulin resistance in the offspring: the Pune Maternal Nutrition Study. *Diabetologia* 51(1):29–38
63. Lewis SJ et al (2009) Body composition at age 9 years, maternal folate intake during pregnancy and methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T genotype. *Br J Nutr* 102(4):493–496
64. Lee SJ et al (2005) DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis* 26(2):403–409
65. Luka Z et al (2011) Histone demethylase LSD1 is a folate-binding protein. *Biochemistry* 50(21):4750–4756
66. Chango A, Watkins D, Abdennebi-Najar L (2012) The importance of folate in health. In: Victor R Preedy (ed) *B Vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects*. Royal Society of Chemistry, UK, pp 734–753
67. Kagan RM, Clarke S (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* 310(2):417–427
68. Stefanska B et al (2012) Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components—the implications in cancer prevention. *Br J Pharmacol* 167(2):279–297
69. Lubecka-Pietruszewska K et al (2013) Folic acid enforces DNA methylation-mediated transcriptional silencing of PTEN, APC and RARbeta2 tumour suppressor genes in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 430(2):623–628
70. Liu Z et al (2009) Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent. *Bioorg Med Chem Lett* 19(3):706–709
71. Bouchard L et al (2012) Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes* 61(5):1272–1280
72. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM (1985) Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 100(2):126–131
73. Armstrong RB (1979) *Biochemistry : energy liberation and use*. In: Strauss RH (ed) *Sports Medicine and Physiology*. W.B. Saunders, Philadelphia , pp 3–28
74. Sung K, Bae S (2012) Effects of a regular walking exercise program on behavioral and biochemical aspects in elderly people with type II diabetes. *Nurs Health Sci* 14(4):438–445
75. Faude O, Kindermann W, Meyer T (2009) Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med* 39(6):469–490
76. Beneke R, Leithauser RM, Ochentel O (2011) Blood lactate diagnostics in exercise testing and training. *Int J Sports Physiol Perform* 6(1):8–24
77. Ahlborg G et al (1974) Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J Clin Invest* 53(4):1080–1090
78. Bae JC et al (2012) Regular exercise is associated with a reduction in the risk of NAFLD and decreased liver enzymes in individuals with NAFLD independent of obesity in Korean adults. *PLoS One* 7(10):e46819
79. Dishman RK et al (2006) *Neurobiology of exercise*. Obesity (Silver Spring) 14(3):345–356
80. van Praag H (2008) Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromol Med* 10(2):128–140
81. Romijn JA et al (1993) Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265:380–391
82. Romijn JA et al (1995) Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise. *J Appl Physiol* 79:1939–1945
83. Scomparin DX et al (2011) Low-Intensity swimming training after weaning improves glucose and lipid homeostasis in MSG hypothalamic obese mice. *Endocr Res* 36(2):83–90
84. Andreazzi AE et al (2009) Swimming exercise at weaning improves glycemic control and inhibits the onset of monosodium L-glutamate-obesity in mice. *J Endocrinol* 201(3):351–359
85. Achten J, Jeukendrup AE (2003) Maximal fat oxidation during exercise in trained men. *Int J Sports Med* 24(8):603–608
86. Romijn JA et al (1995) Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise. *J Appl Physiol* 79:1939–1945
87. Scomparin DX et al (2006) Swim training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium L-glutamate-obesity onset in mice. *Life Sci* 79(22):2151–2156
88. Calegari VC et al (2011) Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. *J Endocrinol* 208(3):257–264
89. de Araujo ACC et al (2012) Similar health benefits of endurance and high-intensity interval training in obese children. *PLoS One* 7(8):e42747
90. Slentz CA et al (2007) Inactivity, exercise training and detraining, and plasma lipoproteins. STRRIDE: a randomized, controlled study of exercise intensity and amount. *J Appl Physiol* (1985) 103(2):432–442
91. Goh J, Ladiges WC (2013) A novel long term short interval physical activity regime improves body composition in mice. *BMC Res Notes* 6:66
92. de Carvalho Leite N et al (2013) Glycolytic and mitochondrial metabolism in pancreatic islets from MSG-treated obese rats subjected to swimming training. *Cell Physiol Biochem* 31(2–3):242–256
93. Pangrazi RP, Corbin CB (1990) Age as a factor relating to physical fitness test performance. *Res Q Exerc Sport* 61(4):410–414
94. Draganski B, May A (2008) Training-induced structural changes in the adult human brain. *Behav Brain Res* 192(1):137–142
95. Michelini LC (2007) The NTS and integration of cardiovascular control during exercise in normotensive and hypertensive individuals. *Curr Hypertens Rep* 9(3):214–221
96. Michelini LC (2007) Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(4):369–376
97. Barker DJ (1998) In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 95(2):115–128
98. Vickers MH et al (2005) Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146(10):4211–4216
99. Vega CC et al (2013) Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *Int J Obes (Lond)*. doi:10.1038/ijo.2013.150

100. Oken E et al (2006) Associations of physical activity and inactivity before and during pregnancy with glucose tolerance. *Obstet Gynecol* 108(5):1200–1207
101. Richter EA, Derave W, Wojtaszewski JF (2001) Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol* 535(Pt 2): 313–322
102. Torun B, Viteri FE (1994) Influence of exercise on linear growth. *Eur J Clin Nutr* 48(Suppl 1):S186–S189
103. Cambri LT et al (2011) Metabolic responses to acute physical exercise in young rats recovered from fetal protein malnutrition with a fructose-rich diet. *Lipids Health Dis* 10:164
104. Rice B et al (1999) Effects of aerobic or resistance exercise and/or diet on glucose tolerance and plasma insulin levels in obese men. *Diabetes Care* 22(5):684–691
105. Kriska AM et al (2001) Physical activity, physical fitness, and insulin and glucose concentrations in an isolated Native Canadian population experiencing rapid lifestyle change. *Diabetes Care* 24(10):1787–1792
106. Kriska A (2000) Physical activity and the prevention of type 2 diabetes mellitus: how much for how long? *Sports Med* 29(3):147–151
107. de Oliveira JC et al (2013) Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *J Endocrinol* 216(2):195–206
108. Barella LF et al (2012) Early exposure to a high-fat diet has more drastic consequences on metabolism compared with exposure during adulthood in rats. *Horm Metab Res* 44(6): 458–464
109. Wasinski F et al (2013) Exercise and caloric restriction alter the immune system of mice submitted to a high-fat diet. *Mediators Inflamm* 2013:395672
110. Kizaki T et al (2011) Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 413(3):454–459
111. Patterson CM, Levin BE (2008) Role of exercise in the central regulation of energy homeostasis and in the prevention of obesity. *Neuroendocrinology* 87(2):65–70
112. Gomez-Merino D et al (2007) Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of rats. *Cytokine* 40(1):23–29
113. Benrick A, Wallenius V, Asterholm IW (2012) Interleukin-6 mediates exercise-induced increase in insulin sensitivity in mice. *Exp Physiol* 97(11):1224–1235
114. Gray S, Kim JK (2011) New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab* 22(10):394–403
115. Senn JJ et al (2002) Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51(12):3391–3399
116. Petersen AM, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985) 98(4):1154–1162
117. Pedersen BK, Febbraio MA (2007) Point: interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol* (1985) 102(2):814–816
118. Fidalgo M et al. (2012) Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. *Br J Nutr* 1:1–8
119. Gomez-Pinilla F et al (2011) Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. *Eur J Neurosci* 33(3):383–390
120. Coffey VG, Hawley JA (2007) The molecular bases of training adaptation. *Sports Med* 37(9):737–763
121. Barres R et al (2012) Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab* 15(3):405–411
122. Ronn T et al (2013) A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet* 9(6):e1003572
123. Abu-Farha M et al (2013) Proteomics analysis of human obesity reveals the epigenetic factor HDAC4 as a potential target for obesity. *PLoS One* 8(9):e75342
124. Nakajima K et al (2010) Exercise effects on methylation of ASC gene. *Int J Sports Med* 31(9):671–675
125. Elsner VR et al (2013) Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study. *Exp Gerontol* 48(2):136–139
126. Lovatel GA et al (2013) Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 101:94–102
127. Ronn T et al (2013) A six months exercise intervention influences the genome-wide DNA methylation pattern in human adipose tissue. *PLoS Genet* 9(6):e1003572
128. Ntanasis-Stathopoulos J et al (2013) Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 13(2):133–146
129. Hopkins SA, Cutfield WS (2011) Exercise in pregnancy: weighing up the long-term impact on the next generation. *Exerc Sport Sci Rev* 39(3):120–127
130. Wallberg-Henriksson H, Rincon J, Zierath JR (1998) Exercise in the management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Med* 25(1):25–35
131. Seifert T, Secher NH (2011) Sympathetic influence on cerebral blood flow and metabolism during exercise in humans. *Prog Neurobiol* 95(3):406–426
132. Ivy JL (1997) Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Med* 24(5):321–336
133. Henriksen EJ (2002) Invited review: effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol* 93(2):788–796
134. Bostrom P et al (2012) A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481(7382):463–468
135. Castillo-Quan JI (2012) From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. *Dis Model Mech* 5(3):293–295