



institut français
du **cheval**
et de l'**équitation**



40^{ème} Journée de la Recherche Équine
Mardi 18 mars 2014

Programmation fœtale des anomalies du métabolisme glucidique, de la croissance osseuse et de la prédisposition à l'ostéochondrose chez le poulain

Par

P. Peugnet¹, A. Tarrade¹, M. Dahirel¹, S. Chaffaux¹, D. Guillaume², L. Wimel³, G. Duchamp⁴, F. Reigner⁴, C. Sandersen⁵, D. Serteyn⁵, P. Chavatte-Palmer¹

¹ INRA, UMR 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Jouy en Josas, France, ENVA, Maisons-Alfort, France

² INRA, UMR85, CNRS, UMR 6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France, Université François Rabelais, Tours, France

³ IFCE Station Expérimentale, Chamberet France

⁴ INRA UE 1297 UEPAO, Nouzilly, France

⁵ Clinique équine, Faculté de Médecine Vétérinaire CORD, Université de Liège, Liège Belgique

Résumé

Une forte corrélation entre les événements précoces du développement et les risques de développer des maladies métaboliques à l'âge adulte est établie depuis longtemps chez l'Homme. L'objet de cette étude est de déterminer les impacts à long terme de l'environnement intra-utérin chez le cheval. Un modèle d'augmentation de la croissance fœtale est induit en transférant des embryons poneys dans des juments de trait et un modèle de restriction de la croissance fœtale en transférant des embryons de race selle dans des ponettes. Le suivi des poulains jusqu'à l'âge d'un an montre que la croissance, le métabolisme glucidique et le développement ostéoarticulaire sont influencés par ces modifications de l'environnement maternel *via* des altérations placentaires.

Mots clés : programmation fœtale, cheval, placenta, croissance, insuline

Summary

A strong correlation between early events of the development and risks to develop metabolic diseases in adulthood has been established in humans. The purpose of this work is to determine long term impacts of the intra-uterine environment in horses. A model of increased fetal growth was induced by transferring pony embryos into draft mares and a model of restricted fetal growth by transferring saddlebred embryos into pony mares. Monitoring of the foals until one year of age demonstrated that the growth, glucose metabolism and osteoarticular development are affected by those maternal changes which are mediated by placental alterations.

Key-words: fetal programming, horse, placenta, growth, insulin



Introduction

Il existe chez l'Homme une corrélation entre les événements précoces du développement et le risque de développer des pathologies métaboliques à l'âge adulte. Dès la fin des années 80, les données issues de la cohorte du Hertfordshire ont montré que les individus nés avec un petit poids de naissance (reflet d'un développement fœtal sous-optimal) avaient un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires, une hypertension ou un diabète de type 2 à l'âge adulte (Barker et al, 1989 ; Barker et al, 1993 ; Barker et al, 1993). L'attention s'est ensuite portée sur la nutrition maternelle, facteur essentiel du développement fœtal. En effet, les enfants exposés *in utero* à la famine hollandaise en 1944-45 étaient prédisposés au développement d'une obésité, d'une intolérance au glucose, d'une hypertension ou des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (Ravelli et al, 1998 ; Ravelli et al, 1999). Le décalage entre d'une part les conditions de restriction *in utero* - auxquelles le fœtus s'est adapté - et d'autre part les conditions d'« abondance » post-natale, en induisant une croissance de rattrapage rapide, est susceptible d'augmenter le risque futur d'obésité (Roseboom et al, 2001). Un poids de naissance excessif ou encore le diabète gestationnel peuvent aussi conduire à des perturbations de la programmation du métabolisme de l'individu (Stettler et al, 2002).

Des modèles animaux permettant de manipuler le développement fœtal et néonatal ont confirmé l'impact de l'environnement intra-utérin et néonatal sur la prévalence des pathologies métaboliques de l'adulte (McMullen et Mostyn, 2009). En particulier, le retard de croissance intra-utérin entraîne une augmentation post-natale de la pression sanguine et de l'intolérance au glucose (Poore et Fowden, 2002) et altère différents systèmes hormonaux : insuline/glucagon, rénine/angiotensine et axe hypothalamo-hypophysaire (Gatford et al, 2008 ; Forhead et al, 2000 ; Poore et Fowden, 2003), ces effets étant modulés non seulement par le génotype et par le sexe de l'individu (Levin, 2006 ; Clifton, 2010), mais aussi par la durée, la séquence et l'intensité des perturbations (Fowden et al, 2006).

Chez les animaux de rente, l'étude des origines développementales de la santé et des maladies est d'un intérêt primordial. Elles jouent en effet un rôle dans la programmation des caractéristiques associées aux bénéfices commerciaux, telles que la survie des descendants, leur vitesse de croissance et leur composition corporelle, les qualités de la laine, du lait et de la viande ou encore leurs performances en reproduction (Symonds et al, 2010 ; Wu et al, 2006). Ainsi, les altérations de l'environnement fœtal pourraient poser précocement les limites de la santé et des performances sportives du cheval (Rossdale et Ousey, 2002, Fowden et al, 2013). Le retard de croissance intra-utérin est cause de multiples dysfonctionnements chez les poulains nouveau-nés comme chez les chevaux adultes, car il affecte la microstructure pulmonaire, l'efficacité de la fonction respiratoire, le développement et la fonction musculaire et squelettique et provoque le développement de neuropathies ou d'hyperlipémies (Ansari et al, 1998). Récemment, une étude épidémiologique belge a démontré que les poulains nés de juments supplémentées avec des concentrés pendant la gestation sont susceptibles de développer plus de lésions d'ostéochondrose que ceux nés de juments n'ayant reçu que des fourrages (Van der Heyden et al, 2013). Ces éléments liés à l'environnement intra-utérin relativisent l'importance du génotype et de l'environnement post-natal et soulignent le rôle des événements précoces du développement dans l'évolution des futures aptitudes sportives du cheval. D'autre part, bien que l'impact des conditions précoces de développement sur l'homéostasie énergétique ne soient pas encore bien déterminés chez le cheval adulte, leur étude est d'un intérêt crucial, puisque la résistance à l'insuline est impliquée dans diverses maladies du cheval adulte, telles que le syndrome de Cushing, la fourbure, le diabète de type 2, l'hyperlipémie, l'endotoxémie, l'ostéochondrose ou encore le syndrome métabolique équin (Geor et Frank, 2009 ; Johnson, 2002).

Chez la jument, la placentation est diffuse : le placenta est en contact avec l'endomètre sur l'ensemble de sa surface. L'apport nutritionnel au fœtus est ainsi déterminé par la capacité utérine, elle-même corrélée à la taille maternelle. L'impact des événements précoces du développement sur le développement intra-utérin et post-natal a été confirmé à l'aide de croisements entre chevaux de trait de race Shirehorse et petits poneys Shetland (Walton et Hammond, 1938). Plus récemment, Allen et ses collègues ont utilisé le transfert d'embryons entre des races équinnes de différentes tailles (poneys et pur-sang anglais) comme modèle de restriction (pur sang dans poneys) ou d'augmentation de la croissance fœtale (poneys dans pur sang) : le développement fœtal est affecté par la taille maternelle *via* le développement du placenta (surface, poids et densité des microcotylédons) (Allen et al, 2002). Les poulains issus de ces transferts étaient aussi sujets à des altérations de la pression sanguine, de la réponse des catécholamines à un stress aigu (Giussani et al, 2003) et de la fonction des cellules β des îlots de Langerhans durant la période post-natale immédiate (Forhead et al, 2004).



L'objectif de ce travail est de déterminer les effets à long terme de ces transferts inter-races sur la croissance, sur l'homéostasie glucidique, sur les facteurs endocrines impliqués dans la croissance et sur le développement ostéoarticulaire. Ici, la croissance fœtale a été augmentée expérimentalement en transférant des embryons de races poney et selle dans des juments de trait ou restreinte en transférant des embryons de race selle dans des ponettes. La croissance, l'homéostasie glucidique, les concentrations plasmatiques de certains facteurs endocrines impliqués dans la croissance et la régulation du métabolisme énergétique, ainsi que le statut ostéoarticulaire des poulains ont été analysés de la naissance à l'âge d'un an.

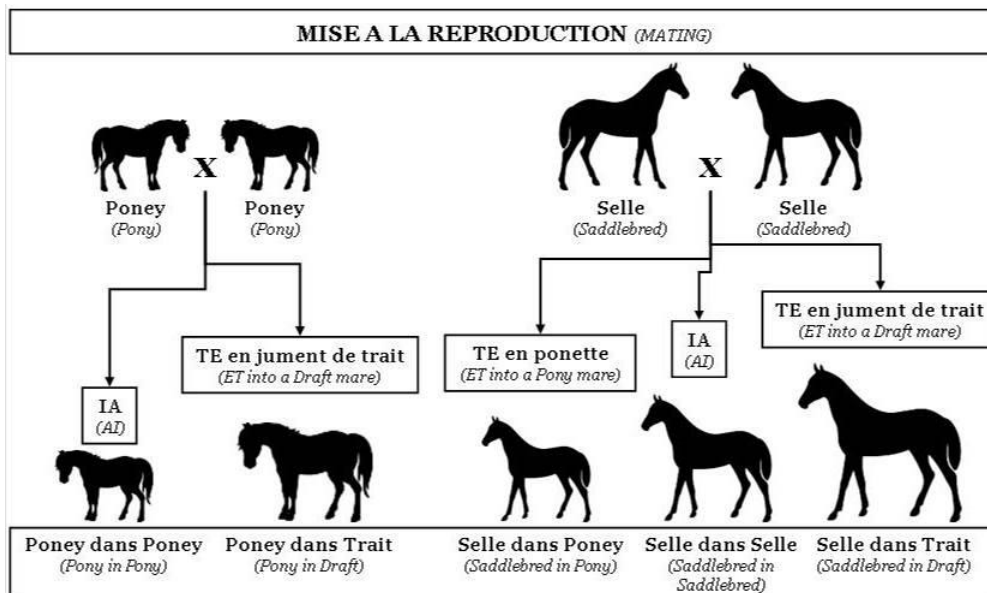
1 Etablissement des modèles de croissance fœtale « augmentée » ou « restreinte »

1.1 Etablissement des gestations témoins et expérimentales

Les gestations ont été obtenues au cours de deux saisons de reproduction successives (poulinages en 2011 et en 2012). Vingt-deux ponettes Welsh de la station expérimentale de l'INRA de Nouzilly et 28 juments de race selle (Anglo-arabes et Selle Français principalement) et 22 juments de trait (Comtoises et Bretonnes) de la station expérimentale de l'IFCE à Chamberet ont été utilisées pour les inséminations artificielles, comme receveuses et pour la production des embryons. Le schéma expérimental est présenté dans la figure I. Les gestations témoins poney dans poney (P-P, n=21) et selle dans selle (S-S, n=28) ont été obtenues par insémination artificielle. Les gestations expérimentales « augmentées » ont été obtenues en transférant des embryons poneys et selles dans des receveuses trait (poney dans trait P-T, n=6 et selle dans trait S-T, n=8). Les gestations expérimentales « restreintes » ont été obtenues en transférant des embryons selles dans des receveuses poneys (selle dans poney S-P, n=6). Afin de limiter la variabilité interindividuelle, la semence d'un seul étalon poney et celle de deux étalons selles a été utilisée.

Figure I : Etablissement des gestations témoins par insémination artificielle (IA) et expérimentales par transfert d'embryon (TE)

Figure I: Establishment of control and experimental pregnancies by artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET), respectively



A partir de l'ovulation, les juments gestantes ont été conduites au pâturage. A partir du quatrième mois de gestation, elles ont été rentrées au boxe et ont reçu une ration à base de foin supplémentée avec des concentrés (du soja ou des granulés commerciaux à Nouzilly ou des concentrés « maison » composé d'orge, de tourteau de soja, de mélasse, de minéraux et de vitamines à Chamberet). Les qualités nutritionnelles des aliments ont été analysées tout au long du protocole, afin d'harmoniser les apports nutritionnels entre les lots répartis sur deux stations. Tous les poulains sont nés entre avril et août (plus de 75% sont nés en mai et juin).

Les résultats sont exprimés sous forme de médiane [quartile 1-quartile 3]. Les deux races (P-P et S-S) d'une part, et les deux lots de poulains poneys (P-P et P-T) d'autre part, ont été comparés avec le test de Mann-



Whitney, tandis que les trois lots de poulains selles (S-P, S-S et S-T) ont été comparés avec le test de Kruskal-Wallis suivi du test *posthoc* de Dunn. Le risque α a été fixé à 0,05.

1.2 Modèles expérimentaux obtenus

A la naissance, les poulains P-T étaient significativement plus lourds que les poulains P-P (+57%, 40,1 kg [33,6-40,9] *versus* (25,5 kg [22,5-32,0]), avec, au cours de la première saison de reproduction, un raccourcissement significatif de la durée de gestation par rapport au groupe P-P (332,1 jours [321,7-333,1] *versus* 339,1 jours [334,3-343,1]). En revanche, les poulains S-T avaient le même poids et la même durée de gestation que les poulains S-S. D'autre part, les poulains S-P avaient un poids de naissance significativement restreint comparé aux poulains S-S (+37%, 31,0 kg [28,0-41,5] *versus*, 49,4 kg [43,9-55,4]) avec une gestation significativement allongée de 14 jours (344,0 jours [334,5-353,8] *versus* 330,8 jours [325,9-336,3]).

En conséquence, deux modèles expérimentaux ont été obtenus : un premier modèle de croissance foetale « augmentée » et accélérée chez les poulains poneys (lot poney dans trait) et un second modèle de croissance foetale « restreinte » et ralentie chez les poulains selle (lot selle dans poney).

1.3 Conduite des poulains de la naissance à l'âge d'un an

Les juments et leurs poulains sont retournés au pâturage 10 jours après le poulinage à Nouzilly et 3 jours après le poulinage à Chamberet. Au sein de chaque station, les poulains mâles et femelles ont été conduits en un seul troupeau, sur une même parcelle, jusqu'au sevrage à l'âge de 180 jours. A partir de cet âge, les poulains ont été rentrés en stabulations ouvertes avec un paddock extérieur et ont reçu une ration à base de foin supplémentée avec des granulés commerciaux à Nouzilly ou les granulés « maison » à Chamberet. Dès le printemps, et jusqu'à un an, les poulains ont de nouveau été conduits au pâturage. Les mâles ont été castrés à un an.

Le poids et différents paramètres staturaux (hauteur au garrot, hauteur de l'antérieur gauche, périmètre thoracique, largeur des épaules et des hanches) ont été mesurés tous les mois jusqu'au sevrage, puis tous les trimestres jusqu'à un an. Les concentrations plasmatiques en Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) et en hormones thyroïdiennes T4 et T3 totales ont été mesurées à la naissance, à 3 jours, 90, 180 et 360 jours. Deux types de tests métaboliques ont permis d'évaluer d'une part la clairance du glucose et la sécrétion d'insuline à 3 et 360 jours (test intraveineux de tolérance au glucose) et d'autre part la sensibilité à l'insuline à 200 jours (clamps hyperinsulinémiques euglycémiques, Rijnen et van der Kolk, 2003). Enfin, des marqueurs sériques de l'activité ostéoblastique (ostéocalcine et isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline isoPAL) et de la dégradation du collagène (hydroxyproline et CTX-II) ont été dosés à 3, 140, 180 et 360 jours. Cette première approche du statut ostéoarticulaire a été complétée par un bilan radiographique des lésions d'ostéochondrose à 200 jours (Denoix et al, 1997).

2 Effets à long terme de l'augmentation et de la restriction de la croissance foetale chez les poulains

2.1 Effets de la race sur les paramètres étudiés chez les poneys et les selles témoins

Les paramètres analysés étaient dans l'ensemble très différents d'une race à l'autre. Si les concentrations en T4 étaient similaires entre les deux races, les concentrations en IGF-1 et en T3 étaient significativement plus élevées chez les poulains P-P *versus* S-S, et ce de la naissance à un an.

Entre 30 jours et un an (sauf à 140 jours), les poulains P-P avaient également une glycémie à jeun significativement augmentée comparé à celle des poulains S-S. A 3 jours, la clairance du glucose et la sécrétion d'insuline étaient similaires entre les deux races, mais à 200 jours, le taux de métabolisme du glucose était significativement diminué et à 360 jours la clairance du glucose était significativement ralentie chez les poulains P-P *versus* S-S (la sécrétion d'insuline restant à mesurer à cet âge).

Les concentrations des marqueurs du turnover osseux étaient ponctuellement diminuées chez les P-P *versus* S-S à 3 jours pour l'isoPAL, à 180 jours pour l'ostéocalcine, à 360 jours pour l'hydroxyproline et à 140, 180 et 360 jours pour le CTX-II. La prévalence de l'ostéochondrose était plus importante dans le lot S-S *versus* P-P (32% *versus* 19%), même si cette différence n'était pas significative.

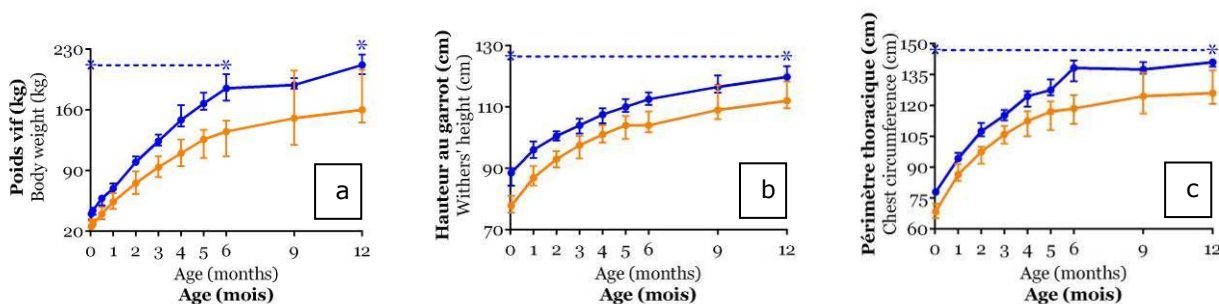


2.2 Effets à long terme de l'augmentation de la croissance foetale chez les poulains poneys

A la naissance, les poulains P-T étaient significativement plus lourds (+57%) que les P-P et cette différence a été conservée jusqu'à l'âge d'un an, où elle était encore de 37% (Figure IIa). Les poulains P-T étaient aussi significativement plus grands (hauteur au garrot, Figure IIb et hauteur de l'antérieur) avec un périmètre thoracique significativement augmenté de la naissance à un an (Figure IIc). Enfin, la croissance des segments osseux correspondant aux largeurs des épaules et des hanches était plus rapide chez les poulains P-T *versus* P-P à l'approche du sevrage, de 120 à 180 jours.

Figure II : Poids vif (a), hauteur au garrot (b) et périmètre thoracique (c) de la naissance à un an, dans les deux lots de poulains poneys

Figure II: Foals' body weight (a), withers' height (b) and chest circumference (c) from birth to one year of age in the two groups of ponies



(Poney dans poney, P-P (●) ; Poney dans Trait, P-T (●)). Les courbes représentent les médianes et les écarts interquartiles. Les valeurs médianes situées entre les astérisques sont significativement différentes entre les deux lots (test de Mann-Whitney, $p < 0,05$) - (Pony in pony, P-P (●); Pony in draft, P-D (●)). Curves are presented as medians and interquartile ranges. Median values between the asterisks significantly differ between both groups (Mann-Whitney test, $p < 0,05$)

Globalement, la concentration en IGF-1 n'était pas affectée par le transfert en jument de trait. En revanche, les concentrations en T3 étaient significativement plus basses chez les poulains P-T *versus* P-P de 3 à 180 jours, ainsi que les concentrations en T4 à 0 et 3 jours. Ces différences avaient totalement disparu à un an.

La glycémie à jeun était également significativement diminuée à 30, 90, 180 and 360 jours chez les P-T *versus* P-P. De plus, à 3 jours, la sécrétion d'insuline en réponse au bolus de glucose a été significativement augmentée chez les P-T *versus* P-P, sans que la clairance du glucose soit modifiée. A 200 jours, le taux de métabolisme du glucose était le même chez les deux lots de poneys, ainsi que la clairance du glucose à 360 jours (la sécrétion d'insuline restant à mesurer à cet âge).

Les concentrations des deux marqueurs de l'activité ostéoblastique étaient significativement augmentées chez les poulains P-T *versus* P-P à 3, 140 et 180 jours pour l'isoPAL osseuse et à 140 et 180 jours pour l'ostéocalcine. Parallèlement, la concentration en hydroxyproline était également significativement diminuée chez les poulains P-T *versus* P-P à 3 et 140 jours, sans que la concentration du second marqueur de la dégradation du collagène (CTX-II) ne soit affectée. Concernant le bilan radiographique à 200 jours, bien qu'aucune significativité n'ait pu être dégagée du fait des faibles effectifs, la proportion d'animaux présentant des lésions d'ostéochondrose était augmentée au sein du lot P-T *versus* P-P (33% *versus* 19%). Aucun des scores attribués aux bilans radiographiques n'était assez élevé pour préjuger d'une incidence clinique.

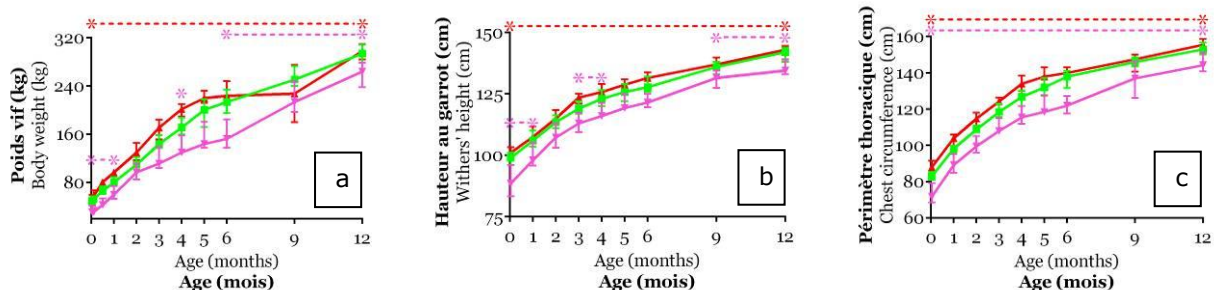
2.3 Effets à long terme de la restriction et de l'augmentation de la croissance foetale chez les poulains selles

Les poulains S-P étaient significativement plus légers (-37%) que les poulains S-S à la naissance, puis aussi lourds que ces derniers à 60, 90 et 150 jours. Cependant au sevrage et à un an, une restriction significative du poids, respectivement de 29 et 27%, était toujours présente chez les poulains S-P *versus* S-S (Figure IIIa). La hauteur de l'antérieur était également significativement restreinte dès 30 jours et jusqu'à un an chez les S-P *versus* S-S, tandis qu'en termes de hauteur au garrot, les poulains S-P les ont ponctuellement rattrapé (à 60, 150 et 180 jours, Figure IIIb). Ces poulains ont également conservé un périmètre thoracique significativement restreint de la naissance à un an (Figure IIIc). La largeur des épaules et des hanches était globalement la même entre les poulains S-P et S-S. Notons enfin que les poulains S-P n'ont jamais rattrapé leur retard de poids, de hauteur au garrot et de l'antérieur et de périmètre thoracique sur les poulains S-T.



Figure III : Poids vif (a), hauteur au garrot (b) et périmètre thoracique (c) de la naissance à un an, dans les trois lots de poulains selles

Figure III: Foals' body weight (a), withers' height (b) and chest circumference (c) from birth to one year of age in the two groups of saddlebreds



(Selle dans poney, S-P (●) ; Selle dans selle, S-S (●) ; Selle dans trait, S-T (●)). Les courbes représentent les médianes et les écarts interquartiles. Les valeurs médianes situées entre les astérisques sont significativement différentes entre les lots S-P et S-S (astérisques rose) et entre les lots S-P et S-T (astérisques rouges) (test de Kruskal-Wallis et *posthoc* de Dunn, $p < 0,05$) - (Saddlebred in pony, S-P (●); Saddlebred in saddlebred, S-S (●); Saddlebred in draft, S-D (●)). Curves are presented as medians and interquartile ranges. Median values between the asterisks significantly differ between S-P and S-S (pink asterisks) and between S-P and S-T (red asterisks) (Kruskal-Wallis and *posthoc* Dunn's test, $p < 0,05$)

De nouveau, la concentration en IGF-1 n'était affectée ni par le transfert en jument de trait, ni par le transfert en jument poney. Les concentrations en T3 étaient significativement plus élevées chez les S-P *versus* S-S à 3 jours et *versus* S-T à 180 jours, ainsi que les concentrations en T4 chez les S-P *versus* S-S à 3 jours et *versus* S-T à 0 et 3 jours. Ces différences avaient totalement disparu au sevrage et à un an.

La glycémie à jeun était également significativement augmentée chez les poulains S-P *versus* S-S à 30 et 90 jours et *versus* S-T à 180, 200 et 360 jours. De plus, à 3 jours, le pic de glucose suite au bolus a été significativement augmenté, tandis que le pic d'insuline tendait à être plus bas chez les poulains S-P *versus* S-T. A 200 jours, le taux de métabolisme du glucose était augmenté chez les S-P *versus* S-T. Enfin, à 360 jours, la clairance du glucose restait inchangée entre les trois lots de poulains selles (la sécrétion d'insuline restant à mesurer à cet âge).

Les concentrations des marqueurs de la dégradation du collagène et de l'isoPAL étaient les mêmes entre les trois lots de poulains selles de la naissance à un an. En revanche, la concentration en ostéocalcine à 3 jours était significativement diminuée chez les S-P *versus* S-S. En termes de lésions d'ostéochondrose, aucune significativité n'a pu être dégagée du fait des petits effectifs. Cependant, la proportion de poulains atteints était augmentée au sein du lot S-P *versus* S-S (67% *versus* 32%), le score radiographique préjugant d'une probable expression clinique. Aucune modification de ces paramètres n'a été observée chez les poulains S-T *versus* S-S.

3 Origines placentaires des altérations de la croissance foetale

Le placenta maintient l'homéostasie foetale en réalisant les fonctions métaboliques, endocrines et d'échange qui, après la naissance, seront prises en charge par les reins, les glandes endocrines, le tractus gastro-intestinal et les poumons du fœtus. La croissance foetale est étroitement liée à l'approvisionnement du fœtus en nutriments maternels, et donc à la fonction de transfert du placenta. Cette dernière est déterminée par la croissance placentaire (Jansson et Powell, 2007) et la composition cellulaire de la bicouche trophoblaste-endomètre (Belkacemi et al, 2010). Les variations de l'apport nutritionnel au fœtus dépendent aussi du développement des réseaux sanguins placentaires (Jansson et Powell, 2007) et du débit sanguin (Bird et al, 2003), ainsi que des variations des niveaux d'expression et d'activité des transporteurs des nutriments (Lesage et al, 2002 ; Araya et al, 1995 ; Malandro et al, 1996). Dans le cadre des modèles d'augmentation et de restriction de la croissance foetale présentés ci-dessus, les caractéristiques morphologiques, morphométriques et d'expression génique du placenta étaient ainsi susceptibles d'être modulées.

3.1 Altérations de la morphologie placentaire dans les modèles d'augmentation et de restriction de la croissance foetale

Les placentas ont été prélevés au poulinage, pesés et leur surface a été mesurée. Le poids et la surface des placentas des poulains P-T (4,5 kg [4,1-4,6] et 7680,0 cm² [6384,9-7850,8]) étaient significativement



augmentés comparé aux poulains P-P (2,5 kg [2,0-3,0] et 2947,7 cm² [2674,6-3095,0]). Chez les poulains S-P (3,5 kg [1,9-3,9] et 4132,8 cm² [3320,4-4750,2]), ils étaient au contraire significativement restreints comparé aux poulains S-S (4,3 kg [4,0- 5,1] et 8018,4 cm² [7117,6-8608,9]) et S-T (5,1 kg [4,7-5,9] et 8722,9 cm² [8219,6-9394,4]). En revanche, ils étaient inchangés entre ces deux derniers lots. Enfin, comme attendu, les placentas des poulains P-P étaient significativement plus légers et plus petits que ceux des poulains S-S. De façon intéressante, l'efficacité placentaire (poids de naissance du poulain rapporté au poids du placenta) n'était affectée ni par la race, ni par le transfert que ce soit dans des juments porteuses poneys ou trait.

3.2 Altérations de la morphométrie dans le modèle de restriction de la croissance foetale

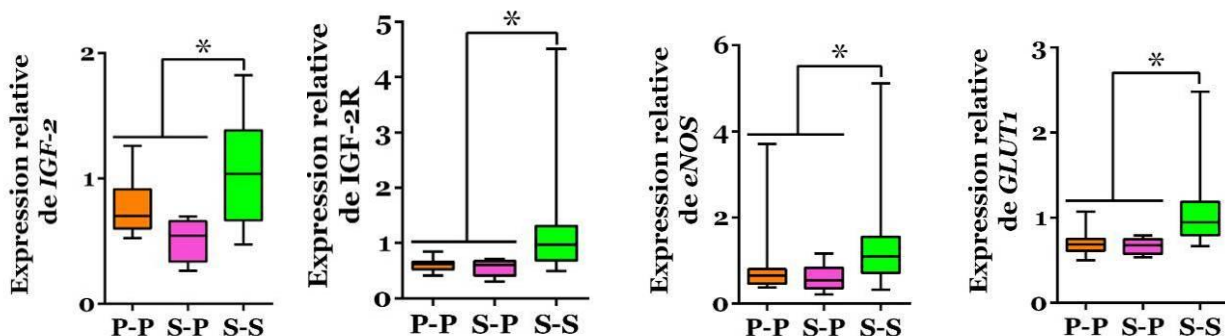
Des échantillons de placenta ont été prélevés à proximité de l'insertion du cordon ombilical et fixés en formol pour analyse histologique. L'observation microscopique n'a permis d'observer aucune anomalie de structure. Cette première approche a été complétée par une analyse morphométrique par stéréologie. Cette méthode permet de quantifier des structures en trois dimensions (nombre, longueur, surface, volume) à partir de coupes d'histologie en deux dimensions (One Stop Stereology du logiciel Mercator Pro, ExploraNova). Ainsi, la densité surfacique des cellules trophoblastiques (cellules d'échange des gaz, nutriments et déchets entre le sang maternel et foetal) dans les microcotylédons (unités d'échange hémotrophique dont les ramifications permettent de maximiser la surface de contact entre les épithéliums maternel et foetal) a été mesurée. Cette densité surfacique - qui représente une surface relative - était augmentée dans les gestations S-P comparé aux gestations S-T. Aucune autre différence morphométrique n'a été observée.

3.3 Altérations de l'expression des gènes placentaires dans le modèle de restriction de la croissance foetale

D'autres échantillons de placenta ont été prélevés à proximité de l'insertion du cordon et congelés dans l'azote liquide pour l'analyse par RT-qPCR de l'expression de gènes impliqués dans la croissance placentaire (*H19*, *IGF-2*, *IGF-2R*, *IGF-1R*, *EGF-R*), la vascularisation (*eNOS*, *VEGFa*, *FLT1*, *KDR*) et le transport des nutriments (*GLUT1*, *LPL*). De manière intéressante, l'expression des gènes codant l'IGF-2, l'IGF-2R, la eNOS et le GLUT1 était significativement diminuée dans les placentas P-P *versus* S-S. De plus, l'expression de ces mêmes gènes était significativement diminuée dans les placentas S-P *versus* S-S (Figure IV). En revanche, ni les placentas P-T, ni les placentas S-T ne présentaient de variations significatives de l'expression des gènes sélectionnés.

Figure IV : Expression placentaire relative des gènes codant l'IGF-2, l'IGF-2R, la eNOS et le GLUT1 dans les lots P-P, S-P et S-

Figure IV: Relative expression of the IGF-2, IGF-2R, eNOS and GLUT1 encoding genes in the P-P, S-P and S-S groups



(Poney dans poney, P-P (●) ; Selle dans poney, S-P (●) ; Selle dans selle, S-S (●)). Les données sont présentées sous forme de boxplots (minimum-maximum). L'astérisque signale les lots significativement différents (test de Mann-Whitney pour la comparaison P-P *versus* S-S et test de Kruskal-Wallis et *posthoc* de Dunn pour la comparaison S-P *versus* S-S *versus* S-T, $p < 0,05$) - (Pony in pony, P-P (●) ; Saddlebred in pony, S-P (●) ; Saddlebred in saddlebred, S-S (●)). Data are presented as boxplots (minimum-maximum). The asterisk indicates which group differs from each other (Mann-Whitney test for the P-P *versus* S-S comparison and Kruskal-Wallis and *posthoc* Dunn's test for the S-P *versus* S-S *versus* S-D comparison, $p < 0,05$)

4 Bilan et applications aux pratiques d'élevage et à l'amélioration de la santé et des performances du cheval adulte

4.1 Bilan des effets à long terme de l'augmentation et de la restriction de la croissance foetale



Cette première partie de l'étude confirme que les poneys ne peuvent pas être considérés comme des chevaux miniatures sur le plan métabolique, les poulains poneys montrant des concentrations en IGF-1 et T3 plus élevées, une glycémie à jeun augmentée et une sensibilité à l'insuline fortement réduite au moins jusqu'à l'âge d'un an comparé aux poulains selles. Ces données vont dans le sens de celles disponibles chez l'adulte relatant une hyperglycémie et une résistance à l'insuline chez les poneys. Ces anomalies sont donc susceptibles d'être retrouvées chez les ponettes receveuses utilisées dans le lot restreint S-P et posent la question de l'impact de ces altérations de l'homéostasie glucidique, combinées à la restriction de la capacité utérine, sur les poulains de race selle.

La restriction de la croissance fœtale induite chez les poulains de race selle induit des irrégularités de la croissance post-natale (rattrapage ponctuel des poulains selles témoins) et une restriction du poids conservée au moins jusqu'à l'âge d'un an. Les poulains restreints S-P ont également des concentrations en T3 et T4 augmentées durant la période post-natale immédiate et une glycémie basale augmentée, au moins jusqu'à l'âge d'un an. Comparés au lot extrême d'augmentation de la croissance fœtale S-T, les poulains restreints S-P ont une plus forte tolérance au glucose immédiatement après le poulinage, ainsi qu'un métabolisme du glucose plus important juste après le sevrage. Cela semble indiquer une sensibilité à l'insuline accrue. Les données de glycémie suite au bolus à un an montrent que les différences ont été gommées. Mais les données d'insulinémie restent à analyser pour conclure quant à cette absence de différence.

L'augmentation de la croissance fœtale affecte davantage les poneys que les selles, probablement car la différence de taille entre les poneys et les chevaux de trait est plus importante qu'entre les selles et les chevaux de trait. Les poneys augmentés P-T sont plus lourds et la plupart de leurs paramètres staturaux sont augmentés au moins jusqu'à l'âge d'un an, avec des concentrations plasmatiques en T3 et T4 diminuées jusqu'au sevrage et une glycémie basale diminuée jusqu'à un an. Dès la naissance, ces poulains augmentés développent une résistance à l'insuline qui n'apparaît qu'en post-sevrage chez les poneys témoins.

4.2 Bilan sur les origines placentaires des altérations de la croissance fœtale

Encore une fois, les placentas des ponettes et des juments de selle se différencient sur un autre plan que la morphologie, avec l'expression de plusieurs des gènes étudiés (*IGF-2*, *IGF-2R*, *eNOS* et *GLUT1*), associés aux différents aspects de la fonction de transfert du placenta (croissance, vascularisation et transport des nutriments), plus faible chez les ponettes. Ces mêmes gènes voient leur expression diminuée dans les placentas associés aux gestations restreintes S-P. Or, le placenta est un tissu d'origine fœtal, et non maternel, il est donc surprenant que les niveaux d'expression de ces gènes dans les placentas des poulains selles restreints soient ramenés à ceux d'une gestation de type poney.

D'autre part, l'augmentation de la surface relative des cellules des microcotylédons impliquées dans les échanges suggère un allongement des villosités qui pourrait accroître la surface de contact fœto-maternel. Tout se passe donc comme si le placenta, capable d'ajustements face aux stress environnementaux et tendant à maintenir la nutrition du fœtus tout au long de la gestation, cherchait à compenser la restriction de la capacité utérine et donc la restriction de la taille du placenta, tout en limitant l'expression des gènes impliqués dans la fonction de transfert placentaire.

4.3 Pratiques d'élevage, santé et performances du cheval adulte

L'incidence des événements précoces du développement sur la vie post-natale du cheval sont désormais avérés, et son étude est d'importance en regard de l'implication de l'insulino-résistance dans un grand nombre de pathologies du cheval adulte : syndrome de Cushing, fourbure, diabète de type 2, hyperlipémie, endotoxémie, ostéochondrose ou encore syndrome métabolique équin. Cette étude introduit l'idée que toutes ces maladies sont susceptibles de trouver, au moins en partie, leur origine dans la vie fœtale. De plus, même si, à ce jour, l'effet du transfert d'embryon sur le développement des lésions d'ostéochondrose n'est pas démontré, les effets sur la croissance des poulains, leur métabolisme glucidique et certains facteurs endocrines ou marqueurs du statut ostéoarticulaire sont très marqués et perdurent sur le long terme. En termes de pratique d'élevage et plus particulièrement de transfert d'embryon, un soin particulier doit être apporté au choix de la jument receveuse, notamment en termes de conformation, mais aussi en termes de métabolisme, chaque race a ses caractéristiques staturales et physiologiques.



Le concept de programmation foetale à long terme de la santé du poulain est à présent vérifié. Tous les facteurs environnementaux susceptibles d'interagir avec l'environnement intra-utérin doivent désormais être envisagés dans la gestion de la jument gestante, et en premier lieu son alimentation.

Références

- Allen W.R., Wilsher S., Turnbull C., Stewart F., Ousey J., et al., 2002. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction* 123: 445-453.
- Ansari T., Beech D., Sibbons P.D., Rosedale P.D., Ousey J.C., et al., 1998. Pilot investigations into microanatomical defects associated with IUGR in the horse and other domestic animals. Sydney, Australia. The Dorothy Havenmeyer Foundation. pp. 15.
- Araya J., Soto C., Aguilera A.M., Bosco C., Monlina R., 1995. Modification of the lipid profile of human placenta by moderate maternal undernutrition. *Revista médica de Chile*, 122: 503-509.
- Barker, D.J., Winter P.D., Osmond C., Margetts B., Simmonds S.J., 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *The Lancet* 2: 577-580.
- Barker D.J., Gluckman P.D., Godfrey K.M., Harding J.E., Owens J.A., et al., 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341: 938-941.
- Barker D.J., Hales C.N., Fall C.H., Osmond C., Phipps K., et al., 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67.
- Belkacemi L., Nelson D.M., Desai M., Ross M.G., 2010. Maternal undernutrition influences placental-fetal development. *Biology of Reproduction* 83: 325-31.
- Bird I.M., Zhang L., Magness R.R., 2003. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284: R245-58.
- Clifton V.L., 2010. Review: Sex and the Human Placenta: Mediating Differential Strategies of Fetal Growth and Survival. *Placenta* 31: S33-S39.
- Denoix J.M., Valette J.P., Robert C., Bousseau B., Perrot P., Heiles P., Houliez D., Audigie F., Moreau H., Blanchard L., Neiman L., Touzot G., Busoni V., Gutton E., Tavernier L., 1997. Etude radiographique des affections ostéo-articulaires juvéniles (AOAJ) chez des chevaux de races françaises âgés de 3 ans : présentation globale des résultats sur 761 sujets. *Bulletin de la Société Vétérinaire Pratique* 81: 53-70.
- Forhead A.J., Broughton Pipkin F., Fowden A.L., 2000. Effect of cortisol on blood pressure and the renin-angiotensin system in fetal sheep during late gestation. *Journal of Physiology* 526 Pt 1: 167-176.
- Fowden A., Giussani D.A., Forhead A.J., 2006. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology* 21: 29-37.
- Fowden A., Jellyman J.K., Valenzuela O.A., Forhead A.J., 2013 Nutritional Programming of Intrauterine Development: A Concept Applicable to the Horse? *Journal of equine veterinary science* 33: 295-304.
- Gatford K.L., Mohammad S.N.B., Harland M.L., De Blasio M.J., Fowden A.L., et al., (2008) Impaired beta-cell function and inadequate compensatory increases in beta-cell mass after intrauterine growth restriction in sheep. *Endocrinology* 149: 5118-5127.
- Geor R., Frank N., 2009. Metabolic syndrome-From human organ disease to laminar failure in equids. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 129: 151-154.
- Giussani D.A., Forhead A.J., Gardner D.S., Fletcher A.J.W., Allen W.R., 2003. Postnatal cardiovascular function after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *Journal of Physiology* 547: 67-76.
- Jansson T., Powell T.L., 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical Science*, 113: 1-13.
- Johnson P.J., 2002. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 18: 271-293.



- Lesage J., Hahn D., Léonhardt M., Blondeau B., Bréant B., Dupouy J.P., 2002. Maternal undernutrition during late gestation-induced intrauterine growth restriction in the rat is associated with impaired placental GLUT3 expression, but does not correlate with endogenous corticosterone levels. *Journal of Endocrinology*, 174: 37-43.
- Levin B.E., 2006. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philosophical transactions of the Royal Society B* 361: 1107–1121.
- Malandro M.S., Beveridge M.J., Kilberg M.S., Novak D.A., 1996. Effect of low-protein diet-induced intrauterine growth retardation on rat placental amino acid transport. *American Journal of Physiology*, 271: C295-303.
- McMullen S., Mostyn A., 2009. Animal models for the study of the developmental origins of health and disease. *Proceedings of the Nutrition Society* 68: 306-320.
- Poore K.R., Fowden A.L., 2002. The effect of birth weight on glucose tolerance in pigs at 3 and 12 months of age. *Diabetologia* 45.
- Poore K.R., Fowden A., 2003. The effect of birth weight on hypothalamo–pituitary–adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *Journal of Physiology* 547: 107-116.
- Ravelli A.C.J., van der Meulen J.H.P., Michels R.P.J., Osmond C., Barker D.J.P., et al., 1998. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *The Lancet* 351: 173-177.
- Ravelli A.C., van Der Meulen J.H., Osmond C., Barker D.J., Bleker O.P., 1999. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *American Journal of Clinical Nutrition* 70: 811-816.
- Rijnen K.E., van der Kolk J.H., 2003. Determination of reference range values indicative of glucose metabolism and insulin resistance by use of glucose clamp techniques in horses and ponies. *American Journal of Veterinary Research* 64: 1260-1264.
- Roseboom T.J., van der Meulen J.H., Ravelli A.C., Osmond C., Barker D.J., et al., 2001. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Molecular and Cellular Endocrinology* 185: 93-98.
- Rossdale P.D., Ousey J.C., 2002. Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. *Equine Veterinary Education* 14: 98-111.
- Stettler N., Zemel B.S., Kumanyika S., Stallings V.A., 2002). Infant Weight Gain and Childhood Overweight Status in a Multicenter, Cohort Study. *Pediatrics* 109: 194-199.
- Symonds M.E., Sebert S.P., Budge H., 2010. Nutritional regulation of fetal growth and implications for productive life in ruminants. *Animal* 4: 1075-1083.
- Van der Heyden L., Lejeune J.P., Caudron I., Dettleux J., Sandersen C., et al., 2013. Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals. *Veterinary Record* 172: 68.
- Walton A., Hammond J., 1938. The maternal effects on growth and conformation in shire horse-shetland pony crosses. *Proceedings of the Royal Society of London B* 125: 311-335.
- Wu G., Bazer F.W., Wallace J.M., Spencer T.E., 2006. Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *Journal of Animal Science* 84: 2316-2337.