



THESE
EN COTUTELLE INTERNATIONALE



N°.....

N°.....

Présentée devant

L'Université de Bourgogne
Sciences de la Vie, Terre et
Environnement,
FRANCE

et

L'Université de Monastir
Faculté de Pharmacie de Monastir,
TUNISIE

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne et de L'Université de Monastir

Option : Physiologie Cellulaire

Par

Oussama GRISSA

Le 01/03/2010

**DEFENSES ANTIOXYDANTES, INFLAMMATION
ET IMMUNOMODULATION, AU COURS DU DIABETE GESTATIONNEL,
DANS LES COMPARTIMENTS MATERNEL, FŒTAL ET PLACENTAIRE**

Composition du Jury:

Président:	Professeur Abdelhedi Miled	Université de Monastir (Tunisie)
Rapporteur:	Docteur Claude Forest	Université de Paris (France)
Rapporteur:	Professeur Kacem Mahdouani	Université de Monastir (Tunisie)
Examineur:	Professeur Aziz Hichami	Université de Bourgogne (France)
Directeur de thèse:	Professeur Naim A. Khan	Université de Bourgogne (France)
Directeur de thèse:	Professeur Zouhair Tabka	Université de Sousse (Tunisie)

CITATION

« Des chercheurs qui cherchent, on en trouve.

Des chercheurs qui trouvent, on en cherche. »

Charles De GAULLE

Je dédie ce travail

À mes très chers parents Abdelhamid et Samira

À ceux que j'aime tant, mon premier chemin était éclairé par vos prières, vous m'avez toujours montré le but à atteindre, et donné les moyens pour y parvenir. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon amour et ma gratitude à votre égard. Que Dieu vous garde et vous alloue santé, bonheur et longue vie.

À ma chère femme Abir

Tes encouragements m'ont toujours été source de motivation, ainsi qu'un support moral et affectif précieux. Merci pour ton esprit de sacrifice, ta générosité inestimable et l'amour dont tu m'as comblé. Que tu trouves dans ce modeste travail l'expression de mon grand amour et le témoignage de ma profonde gratitude.

À mes enfants Bacem et Yacine

Pour tout le temps que je leur ai pris et pour tous les moments de bonheur qu'ils me donnent par leur sourire. Que Dieu les bénisse.

À mon frère Nijed et mes sœurs Fourat et Naïma

Pour les encouragements continus et la bienveillance dont vous m'avez toujours entouré. Je vous souhaite beaucoup de succès dans vos études et beaucoup de bonheur dans votre vie.

À toute la famille Gasdallah, Mohamed, Majida, Houcem et Nadia

Pour votre soutien continu et votre amour profond, vous étiez toujours pour moi ma deuxième famille. Je vous souhaite beaucoup de bonheur et que ce travail soit l'expression de ma grande affection et le témoignage de mon profond attachement.

À mon très cher oncle Dr Kamel Essayem

Je suis infiniment reconnaissant pour les nombreux services consentis. Que ce travail soit l'expression de tout mon amour et de ma profonde gratitude.

À mes grands parents Taïeb et Mannana et à toute la famille Essayem et Grissa

Qu'ils trouvent dans ce travail le témoignage de mon grand amour et mon profond attachement.

À tous mes amis

Pour l'esprit de fraternité et les encouragements continus.

Un remerciement spécial à tous ceux avec qui j'ai collaboré lors de la réalisation de cette thèse au laboratoire "Lipides et Signalisation Cellulaire", je pense à Benoit, Louisa, Ariana, Aude, Celia, Jean-Marc, Virginie, Akadiri, Abdelghani, Eugène et Anne-Marie pour leur soutien et leur bonne humeur.

Mes plus vifs remerciements vont également à tous les chercheurs et le personnel du laboratoire d'endocrinologie de la Faculté de Médecine de Sousse pour leur aide pendant ces années de thèse. Je pense particulièrement à Ines et Sana. Merci aussi à tous mes autres collègues et amis qui se reconnaîtront.

À Monsieur Ridha Charfeddine, Directeur des laboratoires UNIMED

Que je tiens à remercier vivement pour sa compréhension et son ouverture aux valeurs humaines qui ont été grandement appréciées. Qu'il veuille bien recevoir ici mes plus vifs remerciements et mon profond respect.

Mes remerciements vont également à tous mes collègues et mes amis des laboratoires UNIMED. Qu'ils soient assurés de ma sympathie et de ma sincère amitié.

J'ai le plaisir d'exprimer ma sincère gratitude et mes vifs remerciements

À tout le personnel de la maternité, des laboratoires de biochimie et d'hématologie du CHU Farhat Hached de Sousse.

A nos juges,

Monsieur le professeur Zouhair TABKA

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans votre confiance, votre patience et votre générosité. La pleine confiance que vous m'avez accordée dès mon admission dans votre laboratoire m'a permis de m'attacher au monde de la recherche particulièrement en Physiologie. Je voudrais vous remercier aussi d'avoir cru en mes capacités, de m'avoir guidé, de m'avoir encouragé et de m'avoir fourni les meilleures conditions morales et matérielles tout en me laissant une grande liberté.

Monsieur le professeur Naim Akhtar KHAN

Je voudrais vous remercier de m'avoir accueilli au sein de votre équipe. Vous avez su me transmettre, avec beaucoup de patience, tout l'amour et la passion que vous portez à la recherche. Ces années passées dans votre laboratoire auront été pour moi une expérience unique et enrichissante, tant du point de vue scientifique qu'humain. Je ne vous remercierai jamais assez pour vos conseils, pour votre assistance et pour votre encadrement de qualité au cours de ces années. Que cette thèse soit l'occasion de vous témoigner ma reconnaissance pour la sympathie et l'amitié dont vous avez fait preuve à mon égard en toute circonstance.

Monsieur le professeur Abdelhedi MILED

Que je remercie tout particulièrement d'avoir eu l'obligeance de présider ce jury. Je vous remercie vivement d'avoir bien voulu lire et commenter cette thèse et d'être venu cautionner de sa notoriété la présentation de ce travail. Je vous suis infiniment reconnaissant pour votre disponibilité, votre gentillesse et votre aide si bien importante pour mes travaux tout au long de ce parcours.

Le Docteur Claude FOREST

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail m'a profondément touché. Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la recherche sont pour moi une source de motivation supplémentaire pour la suite de notre carrière. Recevez ici, toute ma gratitude et toute ma reconnaissance pour votre disponibilité cordiale, vos conseils pratiques, techniques et scientifiques pour mes travaux de thèse.

Monsieur le professeur Kacem MAHDOUANI

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant d'être rapporteur de cette thèse. Le seul fait de vous avoir rencontré constitue pour moi un immense privilège. Vos qualités scientifiques et votre intérêt pour la science forcent le respect et l'admiration. Toute ma reconnaissance.

Monsieur le maître de conférences Aziz HICHAMI

Qui m'a accordé le grand honneur de juger ce travail en acceptant de siéger dans ce jury. Je vous remercie vivement de me consacrer de votre temps précieux pour juger ce travail. Je vous exprime également toute ma gratitude et ma reconnaissance pour votre encadrement de qualité, votre gentillesse et votre disponibilité sans limite tout au long de mon séjour au laboratoire. Vos compétences scientifiques et techniques dont vous m'avez fait bénéficier m'ont été d'une grande importance. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Table des matières

PREMIERE PARTIE : GENERALITES	1
Introduction	1
CHAPITRE 1.....	5
Physiopathologie du diabète gestationnel et de la macrosomie	5
1.1. Métabolisme du glucose	5
1. 1. 1. Rappels physiologiques	5
1. 1. 2. Rôle de l'insuline	6
1. 2. Métabolisme du glucose au cours d'une grossesse normale	9
1. 2. 1. Modifications du métabolisme du glucose lors de la grossesse normale	9
1. 2. 2. Insulino-sécrétion et insulino-résistance	9
1. 3. Diabète	10
1. 3. 1. Diabète de type 1	11
1. 3. 2. Diabète de type 2	11
1. 3. 3. Diabète gestationnel	12
1. 3. 4. Autres formes de diabète.....	20
CHAPITRE 2.....	21
Cytokines, adipokines et système immunitaire	21
2. 1. Le tissu adipeux : une glande endocrine	21
2. 1. 1. Notions générales.....	21
2. 1. 2. Adipokines et cytokines : différence, similitude et relation.....	22
2. 1. 3. L'adiponectine	23
2. 1. 4. La leptine	26
2. 1. 5. Le facteur de nécrose tumorale alpha	28
2. 1. 6. L'interleukine 6.....	34
2. 2. Le système immunitaire	38
2. 2. 1. Immunité naturelle.....	39
2. 2. 2. Immunité adaptative	39
2. 3. Les cellules immuno-compétentes.....	39
2. 3. 1. Les phagocytes mononuclées.....	39
2. 3. 2. Les phagocytes polynucléaires	40

2. 3. 3. Les lymphocytes	40
2. 4. Inflammation et immunité : implications dans l'obésité et le diabète	42
2. 4. 1. Cellules Th1 et cellules Th2	42
2. 4. 2. Cellules Th1 et Th2 dans l'obésité et l'insulino-résistance.....	45
2. 4. 3. Modulation des cellules Th1/Th2 par la leptine, l'adiponectine et l'insuline	45
2. 4. 4. Rôle des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) dans l'obésité et l'insulino-résistance	46
2. 4. 5. Interactions entre adiponectine, leptine, IL-6 et TNF- α	49
2. 5. Inflammation placentaire et insulino-résistance	50
CHAPITRE 3.....	52
Diabète gestationnel, macrosomie et statut antioxydant	52
3. 1. Le stress oxydant et ses origines.....	52
3. 1. 1. les radicaux libres	52
3. 1. 2. Production des radicaux libres et naissance du stress oxydant	52
3. 1. 3. Fonction biologique des radicaux libres	56
3. 1. 4. Surproduction des radicaux libres.....	57
3. 2. Défense de l'organisme contre le stress oxydatif	57
3. 2.1. Les antioxydants endogènes enzymatiques.....	59
3. 2.2. Les antioxydants endogènes non enzymatiques.....	61
3. 2.3. Les antioxydants exogènes non enzymatiques	62
3. 3. Évaluation du stress oxydant	63
3. 4. Diabète gestationnel, macrosomie et stress oxydatif.....	63
CHAPITRE 4.....	66
L'expression des ARNm des facteurs de croissance et de leurs récepteurs placentaires dans le diabète gestationnel	66
4.1. Mécanismes d'action des facteurs de croissance, de l'hormone de croissance et de leurs récepteurs.....	66
4. 2. Diabète gestationnel, macrosomie et facteurs de croissances.....	85
DEUXIEME PARTIE	87
Apports personnels	89
TROISIEME PARTIE:.....	143
Discussion générale et Perspectives	143

1. Discussion générale	143
1.1. Profil des adipokines au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie	143
1.2. Profil des cytokines Th1 et Th2 au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie	145
1. 3. Statut antioxydant, diabète gestationnel et macrosomie	147
1.4. Profil des lipides circulants au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie	148
1.5. La “mémoire métabolique” <i>in utero</i> semble être impliquée dans la macrosomie au cours du diabète gestationnel	150
1. 6. Diabète gestationnel, macrosomie et facteurs de croissances :.....	151
2. Perspectives	157
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	159

Liste des abréviations

AA	:	Acides aminés
Abs	:	Absent
ADP	:	Adénosine diphosphate
ALT	:	Alanine aminotransférase
AMPK	:	AMP-activated protein kinase
Anti-GAD	:	Glutamic Acid Decarboxylase antibodies
ApoA1	:	Apolipoprotéine A1
ApoB	:	Apolipoprotéine B
AST	:	Aspartate aminotransférase
BCR	:	B Cell Receptor
CD	:	Cluster de différenciation
CHU	:	Centre hospitalo-universitaire
CMH	:	Complexe majeur d'histocompatibilité
Con-A	:	Concanavaline A
CPA	:	Cellules présentatrices de l'antigène
CSF	:	Les facteurs de stimulation des colonies
CTL	:	T cytotoxiques
DG	:	Diabète Gestationnelle
DGM	:	Diabète Gestationnel Mellitus.
DRO	:	Dérivés réactifs de l'oxygène
EGF	:	Epithelium growth factor
ERK	:	Extracellular signal-regulated kinase
FGF-2	:	Fibroblast growth factor
GB	:	Globules blancs
GH-RH	:	GH releasing hormone
GLUT-2	:	Glucose transporter-2
GPx	:	Glutathion peroxydase
GR	:	Glutathion réductase
GSH	:	Glutathion réduit
GSSG	:	Glutathion oxydé
Hb	:	Hémoglobine
HCG	:	Human Chorionic Gonadotropin
HFD	:	High Fat Diet
HGPO	:	Hyperglycémie provoquée par voie orale
HLA	:	Human Leucocyte Antigen
HPL	:	Hormone Placentaire Lactogène
HTA	:	Hypertension artérielle
ICAM	:	Intercellular Adhesion Molecule
IFN- γ	:	Interféron- γ
IgE	:	Immunoglobulines de type E
IGF-1	:	Insulin-like Growth Factor-1
IGF-BP	:	IGF-binding protéines
IL-6	:	Interleukine- 6
iNOS	:	inducible NO synthase
IR	:	Récepteurs de l'insuline
JAK	:	Janus kinase

<i>JNK</i>	:	<i>c-jun NH2-terminal-kinase</i>
<i>LPS</i>	:	<i>Liposaccharide</i>
<i>MAPK</i>	:	<i>Mitogen activated protein kinases,</i>
<i>MCP-1</i>	:	<i>Monocytes de type 1</i>
<i>MDA</i>	:	<i>Malondialdéhyde</i>
<i>mTOR</i>	:	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<i>NDDG</i>	:	<i>National Diabetes Data group</i>
<i>NF-kB</i>	:	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
<i>NFS</i>	:	<i>Numération formule sanguine</i>
<i>NK</i>	:	<i>Natural killer</i>
<i>NOD</i>	:	<i>Non Obese Diabetic</i>
<i>NS</i>	:	<i>Non significatif</i>
<i>OMS</i>	:	<i>Organisme Mondiale de la Santé</i>
<i>P</i>	:	<i>Probabilité</i>
<i>PAI1</i>	:	<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
<i>PDGF</i>	:	<i>Facteurs de croissance dérivée des plaquettes</i>
<i>PDGFR</i>	:	<i>Récepteurs des facteurs de croissance dérivée des plaquettes</i>
<i>PHA</i>	:	<i>Phytohémaglutinine</i>
<i>PI3-K</i>	:	<i>Phosphatidyl-inositol-3-kinase</i>
<i>PN</i>	:	<i>Poids de naissance</i>
<i>PWK</i>	:	<i>Pokeweed Mitogen</i>
<i>R.C.I.U</i>	:	<i>Retard de croissance intra-utérin (hypotrophie)</i>
<i>RAS</i>	:	<i>Rien à signaler</i>
<i>RLO</i>	:	<i>Radicaux libres oxygénés</i>
<i>ROS</i>	:	<i>Substances réactives à l'oxygène</i>
<i>SAT</i>	:	<i>Statut Antioxydant Total</i>
<i>SOD</i>	:	<i>Superoxyde dismutase</i>
<i>SRIH</i>	:	<i>Somatropin Release Inhibiting Hormone ou somatostatine</i>
<i>STAT</i>	:	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
<i>T.A.Maxima</i>	:	<i>Tension artérielle maximale</i>
<i>TA</i>	:	<i>Tissu Adipeux</i>
<i>TCR</i>	:	<i>T Cell Receptor</i>
<i>TGF-β</i>	:	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
<i>TGF</i>	:	<i>Facteurs de croissance transformant</i>
<i>TGF-β1</i>	:	<i>Transforming Growth Factor-beta-1</i>
<i>Th1</i>	:	<i>T helper</i>
<i>TLR</i>	:	<i>Toll-like receptors</i>
<i>TNF-α</i>	:	<i>Tumor necrosis factor- α</i>
<i>TSC2</i>	:	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
<i>VEGF</i>	:	<i>Facteur Endothélial Vasculaire de Croissance</i>

Liste des figures

Figure 1: Mode d'action de l'insuline	8
Figure 2: Dépistage et diagnostic du diabète gestationnel.....	13
Figure 3: L'adipocyte : une cellule endocrine	22
Figure 4: Structure primaire (A) et diverses formes circulantes (B) de l'adiponectine.....	24
Figure 5: Synthèse du TNF- α	29
Figure 6: La famille moléculaire du récepteur du TNF- α	30
Figure 7: Les voies de signalisation cellulaire induite par le TNF- α	31
Figure 8: Modifications déclenchées par TNF- α	32
Figure 9: Sécrétion des cytokines et des adipokines, et leurs implications dans l'insulino-résistance	33
Figure 10: Représentation schématique du gène de l'IL-6 humaine et des gènes de régulation en amont de celui-ci.....	34
Figure 11: Mécanisme d'action intracellulaire des récepteurs d'IL-6.....	35
Figure 12: Résumé schématique des activités de l'IL-6.....	36
Figure 13: Le développement du tissu adipeux s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires qui peuvent participer aux complications	37
Figure 14: Mécanisme d'action du système immunitaire.....	38
Figure 15: Le concept Th1-Th2	42
Figure 16: Différenciation des lymphocytes Th0 en cellules Th1 et Th2 et leurs modulations	44
Figure 17: Classification schématique de la nocivité des radicaux libres sur l'organisme humain.....	53
Figure 18: La transformation de l'énergie dans la mitochondrie et production des radicaux libres.....	54
Figure 19: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en Biologie	56
Figure 20: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques	59
Figure 21: Réactions chimiques liées aux antioxydants	61
Figure 22: Mode d'action des facteurs de croissance IGFs avant et après la naissance	67
Figure 23: Structure d'IGF-I	68
Figure 24: Structure des récepteurs à IGFs et de l'insuline.....	69
Figure 25: Représentations schématiques des différents récepteurs avec leur partie extra-cytoplasmique (vers le haut) et leur partie intra-cytoplasmique, essentiellement constituées par différents domaines tyrosine-kinase .	70
Figure 26: Mécanisme d'action de l'insuline et d'IGFs simplifié	71
Figure 27: Structure de l'EGF	73
Figure 28: Mode d'action des EGF au niveau cellulaire	75
Figure 29: PDGF ligands et récepteurs	77
Figure 30: Mécanisme cellulaire d'action de PDGF simplifié	79
Figure 31: Physiologie de sécrétion de hGH	82
Figure 32: Contrôle hormonal du développement : interactions fœto-maternelles	85

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

Macrosomie et diabète

Introduction

Introduction

Le diabète est un état d'hyperglycémie chronique relevant de facteurs génétiques et exogènes, agissant conjointement (définition OMS : Organisation Mondiale de la Santé). C'est une maladie chronique complexe en expansion qui concerne des millions de personnes à risque dans le monde (Djrolo et coll., 2003; King, 1996). Il est devenu en quelques années une véritable épidémie touchant plus de 150 millions de personnes.

Cette maladie, avec laquelle on apprend à vivre tout au long de sa vie, fait encore peur aujourd'hui. Le diabète correspond à une élévation anormale de la glycémie, définie par le taux de glucose dans le sang. Près de 90 % des diabétiques vivent pendant des années avec cette maladie sans le savoir car le diabète ne provoque en général pas de manifestations pendant une très longue période. Le diagnostic du diabète s'effectue le plus souvent lorsque les premières complications surviennent. Un délai de 7 ans environ s'écoule entre le moment où une glycémie est anormalement élevée et le diagnostic du diabète.

Selon l'OMS on distingue :

- ✓ Le diabète de type I : auto-immun ou idiopathique ;
- ✓ Le diabète de type II : avec insulino-résistance ou avec anomalie de l'insulino-sécrétion ;
- ✓ Autres types de diabète expliqué par :
 - anomalies génétiques impliquant l'insulino-sécrétion ;
 - anomalies génétiques impliquant l'action de l'insuline ;
 - pathologie du pancréas endocrine ;
 - endocrinopathie ;
 - action des médicaments ou toxiques ;
 - infection ;
 - formes inhabituelles de diabète immunologique ;
 - autres syndromes génétiques parfois associés à un diabète ;
- ✓ Diabète gestational, qui est le désordre métabolique le plus fréquent affectant 1-10% de toutes les grossesses (Gabbe, 1986). C'est généralement un phénomène temporaire qui apparaît pendant la grossesse, habituellement au second ou au troisième trimestre. Cependant, il pourrait causer des complications métaboliques non seulement à la mère mais aussi à l'enfant. Les complications majeures du diabète gestationnel comportent les désordres hypertensifs maternels, l'hypoglycémie néonatale, la jaunisse (ictère) et

les traumatismes à la naissance incluant la dystocie des épaules (Coustan, 1997). L'effet le plus communément rapporté sur les nouveaux-nés est la **macrosomie**, qui constitue l'un des facteurs qui pourrait contribuer à l'émergence de l'obésité infantile.

La macrosomie fœtale, indépendamment de sa cause et de son retentissement, est associée à un ensemble de complications ou pathologies tant chez l'enfant que chez la mère, à court et à long terme (Batallan et coll., 2002; Jolly et coll., 2003). Plus particulièrement, elle est très fréquente dans les grossesses des femmes diabétiques (Schwartz and Teramo, 2000). Son étude se justifie particulièrement en Tunisie où son incidence représente 10,11% du total des naissances, selon une étude prospective récente sur la population générale en 2002, (Lahmidi, 2002). On admet généralement qu'il y a macrosomie (ou obésité fœtale) si le poids de naissance à terme dépasse 4000g, et si ce poids de naissance est dû à une croissance somatique, et non pas à un excès de liquide extra-cellulaire (Spellacy et coll., 1985). La macrosomie est associée, chez la mère, à un risque élevé, de traumatisme obstétrical, de délivrance par césarienne, d'un travail d'accouchement long et de mortalité maternelle accrue (Meshari, De Silva, and Rahman, 1990; Stevenson et coll., 1982). Les nouveaux-nés macrosomes sont particulièrement exposés aux risques de mortalité périnatale, de traumatisme, de malformations congénitales, des altérations placentaires et de troubles métaboliques (Coughlan et coll., 2004; Meshari, De Silva, and Rahman, 1990; Stevenson et coll., 1982).

Au-delà de ces effets maternels et néonataux, un excès de poids de naissance peut induire des conséquences à plus long terme. Chez l'enfant, la macrosomie prédispose à la survenue d'une obésité dans l'enfance ou à l'adolescence, pathologie qui constitue un facteur de risque cardio-vasculaire, et de diabète non-insulino-dépendant (Sacks, 1993).

Face à toutes ces complications associées à la macrosomie fœtale, son dépistage, sa surveillance et même la prévention de sa survenue doivent être envisagés.

En effet, les taux élevés du glucose sanguin chez les mères diabétiques et leurs nouveaux-nés ont été considérés comme induisant le **stress oxydatif** (Kamath et coll., 1998) qui, à son tour, provoque la génération de substances réactives à l'oxygène (ROS), toxiques pour la membrane plasmique des cellules. **Au cours du diabète gestationnel aussi bien que lors de la macrosomie, la glycation protéique et l'auto-oxydation glucidique peuvent aussi générer des radicaux libres qui catalysent la peroxydation lipidique** (Hunt, Smith, and Wolff, 1990). Les effets biologiques de ces ROS sont normalement contrôlés *in vivo* par des antioxydants endogènes tels que les vitamines A, C et E, le glutathion et les enzymes antioxydants (Guemouri et coll., 1991; Therond et coll., 2000). De nombreuses études ont montré une augmentation des marqueurs du stress oxydatif au cours du diabète gestationnel (Leinonen et

coll., 1997; Nourooz-Zadeh et coll., 1995), ainsi qu'une diminution des mécanismes de défense vis-à-vis des substances radicalaires (Opara et coll., 1999; Rehman et coll., 1999). ***Comment se présente le profil de ces vitamines et de ces enzymes antioxydants lors de cette pathologie?***

Par ailleurs, ***plusieurs études ont démontré l'importance de l'activation du système immunitaire et de l'état inflammatoire chez les sujets obèses et diabétiques de type 2*** (Rabinovitch, 1994; Rengarajan, Szabo, and Glimcher, 2000). Cette observation est fondée sur le fait que l'insulino-résistance est liée à l'augmentation des médiateurs pro-inflammatoires chez ces sujets. De plus, il a été rapporté que les adipokines (adiponectine et leptine), libérées par les adipocytes, modulent également l'état inflammatoire lors de l'installation de ces pathologies. Le système immunitaire, particulièrement l'immunité à médiation cellulaire, jouerait un rôle primordial dans l'équilibre de l'état anti- et pro-inflammatoire lors du développement de l'insulino-résistance. ***Quel pourrait être le rôle des cytokines, des adipokines et de leur récepteur nucléaire au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie?***

D'un autre côté, des études récentes ont montré qu'il existe une variété de facteurs de croissance qui jouent un rôle important dans la croissance fœtale (Zollers et coll., 2001). En effet, l'insuline et les facteurs de croissance apparaissent comme des médiateurs clefs de l'apport énergétique au fœtus, lui-même sous la dépendance de la coopération materno-placentaire. ***Une bonne compréhension de la croissance fœtale et de sa relation avec les facteurs de croissance maternelle, fœtale et placentaire, est donc indissociable d'une étude approfondie.***

La première partie de cette thèse, consacrée aux généralités, comporte quatre chapitres. Dans le premier chapitre, nous présentons la physiopathologie du diabète gestationnel et de la macrosomie. Le second chapitre fait état du rôle des cytokines, des adipokines et du statut immunitaire lors de ces pathologies. Le troisième chapitre fait état des connaissances actuelles sur le statut antioxydant et enfin le quatrième chapitre fait le point sur l'implication des facteurs de croissance dans la croissance fœtal au niveau maternel fœtal et placentaire, pendant le diabète gestationnel et la macrosomie.

La deuxième partie rassemblera les publications issues des résultats de nos travaux.

La troisième partie sera consacrée à la discussion des différents résultats publiés dans les articles, ainsi qu'aux conclusions et perspectives qu'offrent les résultats de notre travail.

*Physiopathologie du diabète
gestationnel et de la macrosomie*

Chapitre I

CHAPITRE 1

Physiopathologie du diabète gestationnel et de la macrosomie

Le diabète se définit, chez l'Homme, par un état d'hyperglycémie chronique, soit une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l (7 mMol/l), ou une glycémie non à jeun supérieure à 2 g/l (11 mMol/l), retrouvée à 2 reprises (de Strasbourg, 2001). Dans la majorité des cas, il est asymptomatique. La découverte du diabète se fait de manière fortuite (glucosurie dépistée), ou lors du bilan d'une personne à risque (parent du 1^{er} degré présentant un diabète de type 2), mais dans certains cas il est découvert à l'occasion d'une complication. Se caractérisant par un excès permanent de glucose dans le sang, le diabète peut résulter de nombreux facteurs génétiques et/ou environnementaux agissant souvent conjointement. Au centre de cette maladie chronique, on retrouve une carence en insuline, cette hormone indispensable à l'utilisation du glucose par les cellules de l'organisme.

1.1. Métabolisme du glucose

1. 1. 1. Rappels physiologiques

Le glucose est le substrat énergétique le plus rapidement utilisable par les cellules de l'organisme. La glycémie est déterminée par l'équilibre entre le glucose libéré dans le compartiment extracellulaire (apports exogènes, réserves endogènes) et le glucose consommé par les différents tissus de l'organisme. Le glucose ingéré lors d'un repas est absorbé au niveau de l'intestin grêle, puis passe dans le système porte jusqu'au foie où une partie (environ 30%) est captée par les hépatocytes puis métabolisée. Le reste (environ 70%), passe dans la circulation systémique pour être utilisé par des tissus périphériques, essentiellement les muscles. Entre les périodes de repas, des réserves endogènes de glucose permettent de fournir du sucre aux organes si nécessaire. Ces réserves sont essentiellement constituées dans le foie, car il contient du glycogène d'une part, et est capable de produire du glucose par la gluconéogenèse d'autre part. Le glycogène hépatique est une forme de stockage de glucose immédiatement mobilisable en cas de besoin tel un jeûne ou un exercice musculaire important. La gluconéogenèse quant à elle fournit du glucose endogène à partir de substrats non glucidiques qui sont le lactate, le pyruvate, les acides aminés et le glycérol, généralement lors de jeûne prolongé. Certains organes comme le foie, le muscle, et le tissu adipeux dépendent de l'insuline pour utiliser le glucose. D'autres, au contraire, peuvent assimiler le glucose sans insuline. Il s'agit du cerveau, de la médullaire rénale, de la rétine, des muscles

squelettiques et des hématies. Dans ces organes, l'utilisation du glucose est fonction du niveau de la glycémie.

Plusieurs hormones interviennent dans la régulation du métabolisme glucidique. La seule hormone hypoglycémisante est l'insuline, qui stimule la synthèse de glycogène et de lipides, ainsi que le transport de glucose à l'intérieur des cellules. Par ailleurs, elle inhibe la gluconéogenèse et la glycogénolyse hépatique. Les autres hormones, sont hyperglycémisantes (Porcellati et coll., 2003). Il s'agit du glucagon, des catécholamines, de l'hormone de croissance, et des glucocorticoïdes (Vella, Service, and O'Brien, 2003). Le glucagon augmente la production de glucose par le foie par le biais d'une stimulation de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse, et en diminuant la production de glycogène. Les catécholamines agissent en stimulant la libération de glycogène hépatique. L'hormone de croissance et l'IGF-1 (*insuline-like growth factor*) stimulent la production hépatique de glucose et réduisent son utilisation périphérique (Frystyk et coll., 2003). Finalement, les glucocorticoïdes potentialisent les effets du glucagon et des catécholamines, et entraînent une insulino-résistance.

1. 1. 2. Rôle de l'insuline

1. 1. 2. 1. Aspects généraux

In vivo, l'insuline résulte de la maturation protéolytique d'un polypeptide précurseur inactif, la pro-insuline ($t_{1/2} = 30$ min). Cette molécule précurseur est produite par le réticulum endoplasmique des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Lors de sa maturation, cette molécule est clivée et transportée dans l'appareil de Golgi, où elle est stockée dans des granules sécrétoires. La maturation de ces granules aboutit à l'insuline mature et fonctionnelle, peptide composé de 2 chaînes d'acides aminés unies par des ponts disulfures, et à un petit peptide, le C-peptide. L'insuline circule sous forme libre dans le plasma, et possède une courte demi-vie de l'ordre de quelques minutes ($t_{1/2} = 4$ min) en raison d'un important effet de premier passage hépatique. Rappelons ici que l'insuline est la pierre angulaire du traitement du diabète et qu'elle a été administrée pour la première fois à un humain en 1922 (Best, 1956).

1. 1. 2. 2. Régulation de l'insulino-sécrétion

Un pancréas humain normal sécrète 40 à 50 unités d'insuline par jour. La concentration basale d'insuline dans le sang lors de période de jeûne est d'environ 0,4 ng/ml (ou 69 pmol/l). Une dizaine de minutes après l'ingestion d'un repas, on observe une augmentation de la concentration sanguine périphérique d'insuline, qui atteint son pic après environ 30 à 45

minutes. Chez le sujet normal, il est rare que le taux d'insuline s'élève au-delà de 690 pmol/l après un repas. Par la suite, il y a une diminution assez rapide de la glycémie qui revient aux valeurs basales après 90 à 120 minutes environ. Plusieurs molécules stimulent la sécrétion de l'insuline. Le glucose représente le stimulus principal, mais certains acides aminés (arginine, leucine, lysine) ont aussi un effet stimulant direct. Il existe une sécrétion basale d'insuline (c'est-à-dire en l'absence de stimuli) en présence d'une glycémie normale, à savoir 4,4-5,6 mmol/l. Parmi les hormones, l'acétylcholine, le glucagon, l'hormone de croissance, et des hormones gastro-intestinales comme le VIP (*Vaso Intestinal Peptide*) et la gastrine favorisent l'insulino-sécrétion. Au contraire, l'adrénaline, la noradrénaline et la somatostatine ont un effet inhibiteur direct sur la sécrétion de l'insuline.

La régulation de la glycémie est aussi assurée par le système nerveux :

- ✓ Le système sympathique : Une diminution du glucose stimule les récepteurs hormonaux et par l'intermédiaire d'un mécanisme réflexe, qui agit sur la médullosurrénale, il y a une libération de l'adrénaline qui a tendance à augmenter la sécrétion du glucagon et à diminuer ainsi celle de l'insuline (stimulation α adrénergique) ;
- ✓ Le système parasympathique : Il participe à la coordination des réponses hyper et hypoglycémiques. Il intervient à la fois par son effet insulino-sécréteur et à moindre degré par stimulation de sécrétion de glucagon.

La sécrétion stimulée d'insuline en réponse à une charge alimentaire en glucose est en fait une sécrétion biphasique. En effet, on observe une phase précoce de sécrétion d'insuline, suivie d'une phase de sécrétion retardée si la glycémie reste élevée. Toutefois, si la glycémie reste élevée de façon prolongée (> 24 heures), on observe une phase de désensibilisation réversible des cellules β du pancréas en réponse au glucose. Les molécules de glucose pénètrent dans les cellules β par diffusion passive, mais facilitée par l'existence d'un transporteur membranaire spécifique appelé GLUT-2 (*glucose transporter-2*). Étant donné son affinité moyenne pour le glucose, ce transporteur agit surtout durant les phases d'hyperglycémie.

L'action de l'insuline au niveau des tissus cibles se fait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (Stephens and Pilch, 1995). De fait, l'action de l'insuline au niveau des cellules du tissu adipeux, du foie, et des muscles est médiée par l'interaction entre la molécule d'insuline et les récepteurs spécifiques, comme le GLUT-4 (Stephens and Pilch, 1995). Une

fois l'insuline liée à son récepteur, on assiste à un phénomène d'internalisation des récepteurs aboutissant à l'action même de l'insuline. Il apparaît clairement que des anomalies des récepteurs à l'insuline, que ce soit leur concentration, leur affinité ou les deux, vont affecter l'action et l'effet de l'insuline. *Ainsi, au cours du phénomène de « down-regulation », on assiste à une diminution des récepteurs à l'insuline en présence de taux d'insuline chroniquement élevé. Les situations cliniques au cours desquelles on observe ce phénomène sont principalement l'obésité et l'hyper-insulinisme chronique d'origine exogène.*

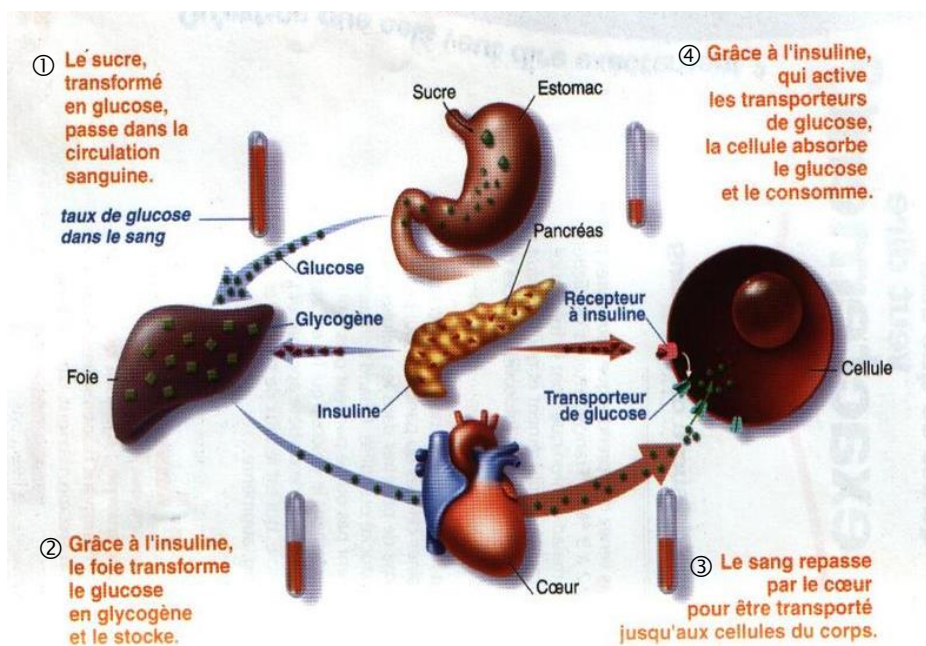


Figure 1 : ① Le sucre transformé en glucose, passe dans la circulation sanguine. ② Grâce à l'insuline, le foie transforme le glucose en glycogène et le stocke. ③ Le sang repasse par le cœur pour être transporté jusqu'aux cellules du corps. ④ Grâce à l'insuline, qui active les transporteurs de glucose, la cellule absorbe le glucose et le consomme.

Figure 1 : Mode d'action de l'insuline.

1. 1. 2. 3. Effets métaboliques de l'insuline

L'effet métabolique principal de l'insuline est de promouvoir le stockage des nutriments ingérés (**figure 1**). Les principaux tissus bénéficiant de cette hormone sont le foie, le tissu adipeux et les muscles. Le foie est le premier organe qu'atteint l'insuline par la circulation sanguine. A ce niveau, cette hormone induit un phénomène anabolique, puisqu'elle stimule la production de glycogène et inhibe simultanément sa dégradation par le biais d'une modulation enzymatique du cycle de synthèse. On assiste aussi en présence d'insuline à une augmentation de synthèse de protéines, de triglycérides et de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) par le foie. La gluconéogenèse est inhibée et la glycolyse est accrue.

En augmentant le transport des acides aminés et la fonction ribosomale, l'insuline stimule la synthèse protéique du muscle. De plus, la synthèse de glycogène est accrue pour pallier aux dépenses musculaires. Bien que ce tissu stocke environ 600 g de glycogène (chez un individu de 70 kg), cette source d'énergie ne peut être utilisée directement en raison du manque de glucose-6-phosphatase, et doit donc transiter par le foie pour le transformer en glucose *via* le lactate.

Le tissu adipeux, ou graisse, est le mode de stockage d'énergie le plus efficace, car il fournit 9 kcal par gramme de tissu. Au niveau de ce tissu, l'insuline augmente la formation de triglycérides dans l'adipocyte par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Premièrement, la triglycéride lipase hydrolyse les triglycérides attachés aux lipoprotéines circulantes. Deuxièmement, en augmentant le transport de glucose vers les adipocytes, l'insuline permet une meilleure utilisation de l' α -glycérol phosphate, une substance importante dans l'estérification des acides gras libres en triglycérides. Finalement, l'insuline empêche la lipolyse intracellulaire en inhibant la lipoprotéine-lipase intracellulaire.

1. 2. Métabolisme du glucose au cours d'une grossesse normale

1. 2. 1. Modifications du métabolisme du glucose lors de la grossesse normale

Les besoins énergétiques du fœtus sont en majorité assurés par le glucose et les acides aminés dont le passage transplacentaire se fait par diffusion. Il existe une sécrétion d'insuline par le fœtus dès la 9^{ème} semaine de gestation, et celle-ci est réglée par l'insulinémie maternelle. C'est l'hyper-insulinémie foetale qui est responsable, du moins en partie, de la morbidité périnatale. En effet, selon la théorie de Pedersen (MacFarlane and Tsakalagos, 1988), l'hyperglycémie maternelle est associée à une hyperglycémie foetale et une surstimulation du pancréas, une hypertrophie des cellules des îlots et une hyperplasie des cellules β qui amènent à une hyper-insulinémie. Cet enchaînement permet d'expliquer la fréquence accrue d'hypoglycémie foetale dans cette situation.

1. 2. 2. Insulino-sécrétion et insulino-résistance

Durant la période initiale (premier trimestre) de la grossesse, la tolérance au glucose est normale, et la sensibilité périphérique à l'insuline du tissu musculaire de même que la production de glucose par le foie sont dans les limites de la norme. Toutefois, on observe une sécrétion d'insuline plus importante lors d'une charge orale en glucose. Bien que l'on n'en connaisse pas la cause, cette augmentation de l'insulino-sécrétion participe, avec les autres hormones comme la progestérone, les oestrogènes et le cortisol, à une lipogenèse et à un

stockage de graisses (Butte, 2000). Malgré cette insulino-sécrétion plus marquée, la glycémie reste quasiment normale, ce qui indique un certain degré d'insulino-résistance. Plus tard dans la grossesse, les taux d'insulinémie basale et post-prandiale augmentent, et vont jusqu'à tripler lors du troisième trimestre (Catalano, 1994). Cette réduction de sensibilité à l'insuline s'expliquerait par l'ensemble des modifications hormonales durant la grossesse. Ainsi, la sensibilité des cellules change parallèlement à la croissance de l'unité foetoplacentaire et à l'élévation de certaines hormones comme le HCG (*Human Chorionic Gonadotropin*), la prolactine, le cortisol et la progestérone. Cette insulino-résistance permet au fœtus de profiter des nutriments de la période post prandiale. La conjugaison de ces deux phénomènes, l'insulino-résistance et l'hyper-insulinémie compensatoire, aboutit à maintenir la tolérance au glucose dans les limites de la normale, bien que légèrement moins bonne que chez la femme non enceinte, tout en garantissant au fœtus des substrats énergétiques en suffisance.

Durant le premier trimestre de la grossesse, la production hépatique de glucose se situe globalement dans les valeurs normales. Toutefois, une étude a montré que lors d'une grossesse normale (non obèse, non diabétique), on assiste à une diminution de la glycémie plasmatique durant le premier trimestre de la grossesse (Mills et coll., 1998). On pense que ceci résulte d'interactions hormonales et métaboliques indépendantes de la consommation foetoplacentaire. Lors du deuxième et troisième trimestre, on assiste à une augmentation de cette production de glucose qui est parallèle à la prise de poids de la mère. Ainsi, la production de glucose par unité de poids corporel reste stable. Il est important de noter que les taux élevés d'insuline continuent de réguler et d'inhiber la production de glucose tout au long de la grossesse.

1. 3. Diabète

Le diabète est un syndrome de déséquilibre métabolique associé à des épisodes d'hyperglycémie en relation avec un déficit vrai ou relatif en sécrétion d'insuline, et/ou d'une diminution de son efficacité biologique. On a traditionnellement classé le diabète selon l'âge du malade lors du diagnostic ou du début des symptômes (« diabète juvénile »). Par la suite, à la fin des années 70, on a employé les termes de diabète insulino-dépendant (type 1) et non-insulino-dépendant (type 2) selon la dépendance d'une prise exogène d'insuline. Toutefois, il est clair que cette façon « thérapeutique » de classer le diabète est grossière, puisque le « type 2 » comprend un ensemble de situations cliniques qui ne correspondent simplement pas à la définition du diabète de type 1. Par ailleurs, avec la mise en évidence d'auto-anticorps

pouvant avoir un rôle pathogène ou du moins déclenchant dans la maladie (Bach, 1994), il semblerait plus logique de classer le diabète selon des critères étiologiques.

1. 3. 1. Diabète de type 1

Il représente environ 10% des diabètes dans le monde occidental. Il s'agit d'un état insulino-prive qui amène à une situation de catabolisme extrême, affectant principalement le foie, les muscles et le tissu adipeux. Ainsi, on assiste à une dégradation anarchique des stocks énergétiques et à une cétose. L'ensemble de ces altérations est réversible avec l'apport d'insuline. Sans entrer dans les détails de la génétique du diabète de type 1, l'ensemble des connaissances actuelles permet de dire qu'il est le résultat de l'agression d'un agent infectieux ou toxique environnemental au niveau des cellules β du pancréas chez des individus génétiquement prédisposés (Cavan, Bain, and Barnett, 1992), résultant en une destruction immuno-médiée de ces cellules particulières pancréatiques. Ainsi, on a détecté des auto-anticorps circulants dirigés contre les cellules β chez plus de 80% de patients atteints de diabète de type 1, et aussi des anticorps anti-insuline et anti-GAD (*Glutamic Acid Decarboxylase antibodies*) (Thivolet et coll., 2002). Le diabète de type 1 survient plus fréquemment chez l'enfant. Toutefois, chez l'adulte, une proportion non négligeable de diabète initialement diagnostiqué comme étant de type 2 se révèle en fait être de type 1 qui évolue à court terme vers une dépendance à l'insuline.

1. 3. 2. Diabète de type 2

Il comprend un ensemble plus hétérogène de situations cliniques où l'on ne retrouve pas d'association HLA (*Human Leucocyte Antigen*), pas de cétose, et pas d'auto-anticorps ; on l'appelle aussi diabète de la maturité ou diabète gras et il est environ dix fois plus fréquent que le diabète de type 1. On ne connaît pas réellement la cause de cette maladie. Les patients souffrant du diabète de type 2 ne sont pas dépendants d'insuline pour survivre, et un certain degré d'insensibilité périphérique à l'insuline a été mis en évidence chez la plupart de ces malades (DeFronzo and Ferrannini, 1991). En effet, ce diabète est dû à une insuffisance endocrine du pancréas à faire face à un état d'insulino-résistance qui est le plus souvent associé à une obésité. Les mécanismes de cette insulino-résistance ne sont pas complètement élucidés. On retrouve une diminution des récepteurs à l'insuline qui serait en partie le résultat d'une *down-regulation* en réponse à un hyperinsulinisme, lui-même étant la conséquence possible d'un trouble de l'insulino-sécrétion. On a aussi évoqué le rôle des acides gras circulants qui, en trop grande quantité, inhibent l'utilisation périphérique du glucose par un phénomène de compétition de l'oxydation entre les lipides et les glucides.

La traduction clinique du diabète - ou des diabètes -, est différente selon qu'il s'agit de diabète insulino-dépendant ou non insulino-dépendant. Ainsi, à un stade évolué, le diabète de type 1 est associé à un tableau clinique d'amaigrissement, de fonte musculaire, de fatigue, de cétoacidose débutante et de déshydratation. A un stade moins avancé, on observe les signes traduisant la carence en insuline que sont la perte de poids assez rapide, la fatigue anormale, la polyurie et la polydipsie. Ce tableau clinique peut évoquer à tort une hyperthyroïdie. La présentation clinique du diabète de type 2 est habituellement asymptomatique, et le diagnostic se fait sur la présence d'une hyperglycémie. Parfois, cette anomalie biologique est associée à un certain degré de fatigue ou de polyurie, voire à une déshydratation évidente. Citons aussi quelques manifestations cliniques parfois révélatrices de la maladie : une candidose génitale, des lésions de folliculites, ou encore des troubles visuels en rapport avec l'hyperglycémie. (Tchobroutsky, 1987).

1. 3. 3. Diabète gestationnel

1. 3. 3. 1. Définition et critères diagnostiques

Le diabète gestationnel (DG) est le trouble du métabolisme des hydrates de carbone le plus fréquent durant la grossesse (Catalano, 1994). De façon pragmatique, le DG se définit comme la présence d'un trouble de la tolérance aux hydrates de carbone qui survient ou qui est diagnostiqué durant la grossesse, et ce quel que soit le terme de la grossesse, le traitement institué et l'évolution dans le *post-partum* (Verier-Mine and Timsit, 1997) (**Figure 2**). Il faut rappeler ici que la grossesse est un état diabétogène, caractérisée par une demande accrue en insuline, une augmentation des hormones diabétogènes et de l'insulino-résistance. Ces changements métaboliques et hormonaux assurent la survie du fœtus, mais contribuent aussi au développement du DG. Il faut souligner qu'en utilisant cette définition, le terme de diabète gestationnel inclut tant les femmes présentant une discrète intolérance aux hydrates de carbone que celles qui resteront diabétiques après l'accouchement. Cette définition somme toute assez grossière a l'inconvénient de regrouper des situations cliniques ayant chacune des caractéristiques propres, tel qu'un diabète de type 1 infra-clinique ou un diabète non insulino-dépendant diagnostiqué durant la grossesse. De plus, cette définition ne prend pas en compte l'importance de l'hyperglycémie, le risque maternel et foetal, ni ne précise les moyens diagnostiques à utiliser (Coustan, 1995). Malgré tout, même s'il existe des opinions diverses quant à sa détection et sa prise en charge, cette définition du DG a le mérite de sensibiliser les praticiens à cette pathologie liée à la grossesse et qui est associée à un risque pour la mère et pour l'enfant (Kjos and Buchanan, 1999).

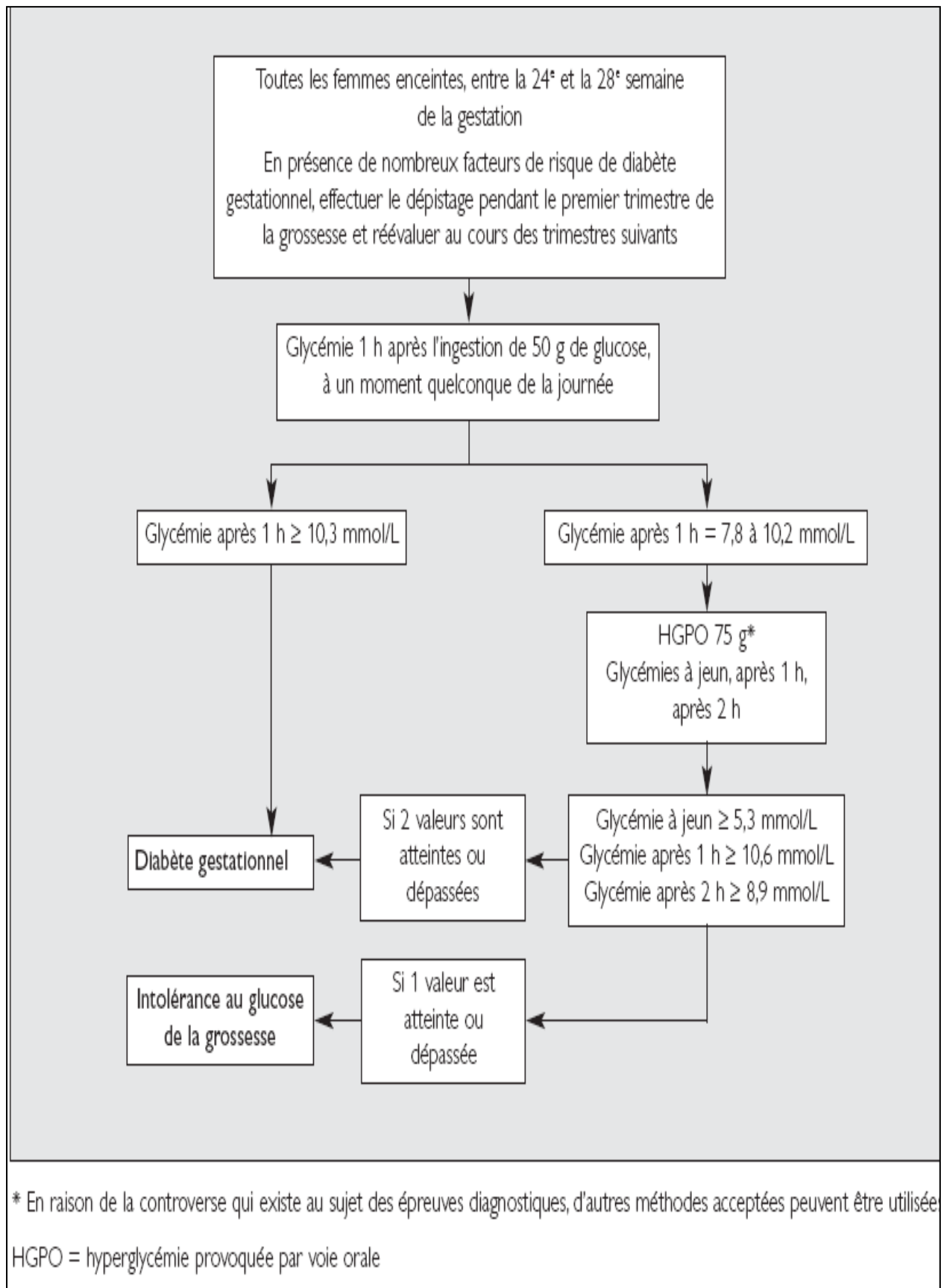


Figure 2: Dépistage et diagnostic du diabète gestationnel.

La définition actuellement reconnue du DG repose sur des valeurs de glycémie mesurées lors d'un test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO), pour lequel il existe plusieurs adaptations. Ainsi, on remarque que les critères de diagnostics du DG diffèrent, avec 3 grandes tendances : critères du NDDG (*National Diabetes Data group*) (1979), critères de (Coustan and Carpenter, 1998) Coustan et Carpenter (1998) et critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (1980). De nombreux congrès internationaux ont tenté de standardiser le dépistage et le diagnostic du DG. Il n'existe actuellement pas encore de consensus d'autant plus qu'on retrouve dans la littérature des arguments en faveur de l'hypothèse d'un *continuum* entre les valeurs glycémiques de la mère pendant la grossesse et le devenir materno-foetal à court terme (Sacks et coll., 1995).

1. 3. 3. 2. Données épidémiologiques

Il existe environ 3% (variant entre 1 et 14% de toutes les grossesses, selon les populations étudiées et les critères diagnostiques retenus) de femmes enceintes qui présentent un DG défini par une intolérance aux hydrates de carbone de gravité variable se manifestant pour la première fois pendant la grossesse (Verier-Mine and Timsit, 1997). Par ailleurs, il faut souligner que la prévalence du DG est influencée par l'origine ethnique (Hadden, 1985; Kjos and Buchanan, 1999). En effet, par rapport à une population européenne caucasienne, la prévalence du DG est environ 10 fois supérieure chez les femmes du sous-continent indien, 8 fois supérieure chez les femmes de l'Asie du sud-est, 6 fois et 3 fois supérieure chez les femmes arabes/méditerranéennes et afro-américaines, respectivement (Dornhorst et coll., 1992).

1. 3. 3. 3. Facteurs de risque de diabète gestationnel

Les femmes exposées à un risque accru de DG sont celles qui ont un antécédent familial de diabète (type 1 ou 2) ou personnel d'intolérance au glucose, un antécédent d'accouchement d'enfant macrosome ou porteur de malformation congénitale, ou encore de mort périnatale. Par ailleurs, on retrouve aussi comme facteurs de risque de DG la présence de glycosurie, un âge maternel supérieur à 35 ans (Jolly et coll., 2000; Khrouf et coll., 1983), une hypertension artérielle et une obésité (poids excédant 20% du poids idéal) (Kjos and Buchanan, 1999).

Le rôle de l'obésité comme facteur affectant le métabolisme des hydrates de carbone a été étudié par (Catalano et coll., 1999). Dans cette étude prospective comparant le métabolisme du glucose chez des femmes obèses qui développaient ou non un DG, on remarquait que les femmes avec DG présentaient un type de réponse au test insulinique

semblable aux résultats obtenus chez les diabétiques de type 2. De fait, ces femmes sont effectivement à risque de développer ultérieurement un diabète de type 2.

1. 3. 3. 4. Causes du diabète gestationnel

D'un point de vue physiopathologique, le DG résulte d'une réponse insulinaire insuffisante en réponse à une charge glucidique, d'une résistance excessive à l'action de l'insuline, ou des deux phénomènes à la fois (Magee et coll., 1993; Statement., 1999). La physiopathologie du DG reste controversée. Il pourrait soit refléter une prédisposition au diabète de type 2 sous l'influence du stress métabolique qu'est la grossesse, soit représenter la manifestation extrême des modifications métaboliques observées lors de la grossesse (Butte, 2000). En effet, il faut rappeler que la sensibilité à l'insuline diminue durant la grossesse de 30 à 60%, qu'il y ait ou pas développement ultérieur de DG. Un DG surviendrait donc si l'organisme ne peut faire face au stress métabolique de la grossesse à cause d'une adaptation insuffisante des cellules β des îlots de Langerhans (Kjos and Buchanan, 1999).

1. 3. 3. 5. Hypothèses physiopathologiques

1. 3. 3. 5. 1. Résistance à l'insuline

Le mécanisme de l'insulino-résistance dans le DG est à l'heure actuelle mal connu (Kuhl, 1998). En effet, il existe au cours de la grossesse normale une sécrétion élevée d'hormones ayant une activité antagoniste de l'insuline, comme l'hormone placentaire lactogène, la prolactine, le cortisol et l'hormone de croissance placentaire (Boden, 1996; Kalkhoff, Kissebah, and Kim, 1978). Quant à l'action de l'insuline au niveau des récepteurs membranaires (ou post récepteurs), il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus à propos d'anomalies clairement en rapport avec le DG. L'observation d'un transport du glucose stimulé par l'insuline, plus altéré chez les femmes enceintes atteintes d'un DG que chez celles ayant une grossesse sans DG, est toutefois importante (Garvey et coll., 1993). En effet, il s'agit vraisemblablement d'une réduction de près de la moitié de GLUT-2 (le principal transporteur de glucose insulino-dépendant pour les cellules musculaires et adipeuses) qui donnerait une base moléculaire à la physiopathologie du DG. Une diminution de la phosphorylation de la tyrosine de la sous-unité β du récepteur à l'insuline fait partie de ces anomalies du transport du glucose chez les femmes atteintes de DG (Friedman et coll., 1999).

1.3.3.5.2. Trouble de la sécrétion pancréatique

Alors que la sécrétion d'insuline augmente de façon graduelle durant la grossesse (Butte, 2000), l'insulinémie n'est pas diminuée chez les femmes atteintes d'un DG. Au contraire, on observe parfois chez ces femmes un taux plus élevé que lors de grossesse sans DG. On observe toutefois des anomalies de la sécrétion insulinaire lors d'une charge en glucose, se situant essentiellement dans la phase précoce de la sécrétion d'insuline (réponse moins importante) (Kjos and Buchanan, 1999), ainsi qu'une perte occasionnelle des oscillations de la sécrétion hormonale (« perte de la pulsativité »). Ces anomalies de sécrétion hormonale peuvent persister en *post-partum* chez les femmes atteintes de DG et représenter un risque de développement ultérieur de diabète de type 2.

1.3.3.5.3. Auto-immunité

Cette hypothèse est supportée par la présence de certains auto-anticorps au cours de grossesse avec DG. Ainsi, on peut observer des anticorps anti-îlots ou anti-insuline. Toutefois, la prévalence de ces anticorps, notamment ceux dirigés contre les îlots de Langerhans, n'est que de 2 à 3% (Damm et coll., 1994), mais les femmes chez qui ces anticorps sont présents sont à risque élevé de diabète de type 1. Une autre interprétation serait qu'il s'agit d'un diabète de type 1 dont le début coïncide avec la grossesse.

1.3.3.6. Conséquences du diabète gestationnel

Le DG représente un risque pour la mère et l'enfant durant la grossesse. De surcroît, il existe également des conséquences à moyen et long terme après l'accouchement pour la mère et l'enfant.

1.3.3.6.1. Risques pour la mère durant la grossesse

La présence d'un DG peut être associée d'une part à des complications durant la grossesse, et d'autre part à la survenue d'un diabète de type 2 ultérieurement. L'hypertension artérielle représente essentiellement la seule morbidité importante de la période post-partum. Alors que l'association DG-hypertension de la grossesse est controversée, elle semble assez claire en ce qui concerne la prééclampsie (Kjos and Buchanan, 1999). Il est donc indiqué de surveiller attentivement les valeurs de tension artérielle, la protéinurie et le poids et ce, surtout durant la seconde partie de la grossesse. Les complications obstétricales du DG sont liées à la prise de poids excessive du fœtus, rendant nécessaires, dans environ 10% des cas, le recours à une césarienne (Sermer et coll., 1998).

1. 3. 3. 6. 2. Risques foeto-placentaires

Le foetus est le plus exposé aux risques liés au DG (Kjos and Buchanan, 1999). Il existe plusieurs complications pour le foetus en présence de DG, bien que celles-ci soient surtout évidentes lorsque l'hyperglycémie est sévère (Schaefer et coll., 1997). Ainsi, les anomalies congénitales et la mort *in utero*, décrites lors du DG mal contrôlé (O'Sullivan et coll., 1973), sont des complications qui sont nettement moins fréquentes lorsque des mesures diététiques et une insulinothérapie sont instaurées tôt durant la grossesse (Landon and Gabbe, 1985). Le risque de complications materno-foetales n'est toutefois pas nul malgré un contrôle optimal de la glycémie (Jensen et coll., 2000; Tallarigo et coll., 1986). Les complications les plus souvent relevées sont la présence de macrosomie, d'hypoglycémie néo-natale, d'ictère, d'hypocalcémie, de polycythémie, et du syndrome de détresse respiratoire (Persson and Hanson, 1998).

Il apparaît que la **macrosomie** représente la plus fréquente de ces complications et la plus significative en terme de morbidité obstétricale. La vision simplifiée comme quoi la macrosomie est la conséquence de l'hyperglycémie maternelle est erronée, car il n'existe pas de corrélation linéaire entre le degré d'hyperglycémie maternelle et le poids de l'enfant à la naissance. En effet, il existe d'autres facteurs maternels comme l'obésité (Snyder, Gray-Donald, and Koski, 1994), la concentration élevée d'acides aminés (Metzger, 1991) et de lipides (Knopp et coll., 1992) qui contribuent au poids de l'enfant. Cette macrosomie est donc multifactorielle et affecte environ 30% des grossesses associées à un DG (Persson and Hanson, 1998). ***Par conséquent, les recommandations thérapeutiques lors de DG s'adressent à diminuer d'une part l'incidence de complications fœtales, et d'autre part bien sûr à assurer un équilibre glycémique à la mère*** (Jensen et coll., 2000; Landon and Gabbe, 1985).

La présence d'un DG n'est pas en soi une indication à une césarienne, même s'il apparaît clairement que le taux de naissance par césarienne chez les femmes atteintes de DG est le double de celui d'une population normale. Ainsi, la décision d'effectuer une césarienne doit se baser sur la croissance fœtale, l'éventuelle prématurité et les risques maternels et fœtaux d'induction du travail. Le placenta est l'interface entre la circulation foetale et maternelle. Il joue donc un rôle important dans la protection du foetus contre les altérations métaboliques maternelles liées au DG. De fait, il a été montré que le transport et le métabolisme placentaire du glucose étaient altérés en présence de DG (Osmond et coll., 2000), ce qui expliquerait en partie les complications possibles pour le foetus. De plus, des

altérations de molécules d'adhésion fonctionnelles placentaires jouent vraisemblablement un rôle dans l'altération de la barrière placentaire (Babawale et coll., 2000).

1.3.3.6.3. Récidive de diabète gestationnel lors de grossesse ultérieure

Plusieurs études ont montré que le risque de développer un DG chez les femmes qui avaient présenté un DG lors d'une première grossesse était de l'ordre de 30 à 50% (Moses, 1996; Philipson and Super, 1989). Les facteurs retrouvés étaient l'ethnie, l'âge de la mère, la prise de poids durant la grossesse, ou la nécessité d'une insulinothérapie lors du premier épisode de DG. De surcroît, une étude récente portant sur un collectif de 78 femmes ayant présenté un DG montrait que 69% d'entre elles présentaient une récidive de DG lors d'une grossesse ultérieure (Major et coll., 1998). Un intervalle de moins de 24 mois entre les deux grossesses ainsi qu'une prise de poids de plus de 7 kilogrammes dans cet intervalle étant significativement associés à cette récidive. Cette association significative entre la récidive de DG et une courte période entre les grossesses peut trouver une explication dans le fait qu'après un DG les altérations du métabolisme des hydrates de carbone peuvent persister quelque temps (Kjos et coll., 1990). En ce qui concerne la prise de poids, ceci n'est pas surprenant au vue de l'association reconnue entre l'intolérance au glucose et l'obésité (Lam et coll., 1991).

Ces résultats montrent donc que la récidive de DG est fréquente, et qu'elle est influencée en partie par des facteurs métaboliques et nutritionnels que l'on observe dans le diabète de type 2.

1.3.3.6.4. Diabète gestationnel et risque ultérieur de diabète pour la mère

Outre le risque maternel et foetal du DG, la question du risque de développer un diabète de type 2 après un épisode de DG est d'une grande importance, quand on connaît le caractère indolent de cette maladie et l'influence d'une prise en charge précoce sur le pronostic (Knowler et coll., 2002; Torgerson et coll., 2004; Tuomilehto et coll., 2001). En effet, il n'est pas inutile de rappeler que les critères d'O'Sullivan pour le DG ont été initialement établis en fonction du risque pour la mère de développer un diabète après la grossesse. Le risque de développer un diabète de type 2 après la découverte d'un DG varie selon les critères diagnostiques imposés et les populations étudiées. Ainsi, la prévalence d'un diabète 15 à 20 ans après se situe vers 60 à 80% chez des femmes latino-américaines (Kjos et coll., 1995), alors que ce chiffre est de l'ordre de 30% dans une population de femmes à moindre risque mais qui ont présenté un DG à 2 reprises au moins (Kjos et coll., 1998). Ce risque est de l'ordre de 2 ou 4% chez les femmes non obèses ou obèses qui avaient une

glycémie normale durant leur grossesse. Il existe des éléments corrélés à l'apparition ultérieure d'un diabète chez les femmes ayant présenté un DG. On peut agir sur certains d'entre eux, alors que d'autres ne sont pas accessibles à un traitement préventif.

- facteurs potentiellement modulables: l'obésité ou la prise de poids après la grossesse, l'exercice physique et l'hygiène alimentaire, la survenue d'une nouvelle grossesse semblent être des facteurs de risque importants à développer un diabète ultérieurement (Peters et coll., 1996).
- facteurs non modulables: ils sont représentés par l'appartenance ethnique, l'anamnèse familiale de diabète, le degré d'obésité au cours de la grossesse, l'importance de la perturbation du métabolisme glucidique durant la grossesse (y compris nécessité d'une insulinothérapie), le métabolisme glucidique dans le *post-partum*.

Les oestrogénostatifs après un DG ne semblent pas jouer un rôle dans le développement ultérieur de diabète (Peters et coll., 1996), alors que l'allaitement maternel contribuerait à diminuer ce risque par le biais d'une perte de poids maternel après l'accouchement. Indépendamment du risque de développer un diabète à long terme, il est intéressant de rapporter que les femmes ayant souffert d'un épisode de DG présentent des anomalies vasculaires qui persistent 3 à 6 mois après l'accouchement, et ce en étant eu-glycémique (Anastasiou et coll., 1998).

1.3.3.6.5. Conséquences à long terme du diabète gestationnel chez l'enfant

Les conséquences immédiates du DG pour l'enfant comprennent les malformations congénitales, la macrosomie, et les modifications métaboliques (hypoglycémie, hypocalcémie, hyperbilirubinémie, polyglobulie). A long terme, les complications à redouter sont le développement d'une obésité et d'un diabète. Le risque accru de devenir obèse pour un enfant né de mère diabétique trouve une explication dans l'influence de l'environnement fœtal sur sa croissance et son équilibre glycémique. Ceci a été démontré chez l'animal né de mère rendue «diabétique» par une alimentation riche en hydrates de carbone et qui développait ultérieurement un diabète et une obésité malgré un poids de naissance normal (Vadlamudi, Kalhan, and Patel, 1995). Chez l'homme, des études chez les Indiens Pima ont également montré que le risque de devenir obèse à l'adolescence était plus grand chez les enfants nés de mères diabétiques et qui avaient un poids de naissance élevé par rapport aux enfants de mères non diabétiques (58 vs 17%) (Pettitt et coll., 1983). Dans une population plus générale, les mêmes auteurs ont observé une corrélation entre la glycémie à 2

heures de l'HGPO pendant la grossesse et l'apparition d'une obésité chez les enfants (Pettitt et coll., 1988).

L'effet délétère à long terme de l'hyperglycémie chronique pendant la gestation sur la descendance montre que l'environnement intra-utérin est un déterminant important du développement de diabète, qui s'ajoute bien sûr aux facteurs génétiques. Une étude chez les Indiens Pima, chez qui l'incidence de diabète est élevée, montre une survenue fréquente et précoce de diabète chez les enfants de mères ayant eu un DG. Ainsi, 45% des enfants nés de mères diabétiques pendant la grossesse ont un diabète vrai à 20 ans, contre 8,6% si la mère avait une intolérance au glucose, et 1,5% si la mère était euglycémique (Pettitt et coll., 1988). Le poids de l'enfant à la naissance n'était pas un facteur déterminant. *Ce risque accru de diabète et d'obésité chez les enfants nés de mère ayant présenté un DG justifie donc un dépistage et une prise en charge précoce au moment de l'enfance et de l'adolescence.*

1. 3. 4. Autres formes de diabète

D'autres formes de diabète ont été individualisées, parmi lesquelles le *diabète de type Mody* (*Maturity Onset Diabetes of Young* ou diabète de type adulte chez le jeune) occupe une place particulière. Il s'agit d'un diabète monogénique, c'est-à-dire dû à la présence d'une seule anomalie génétique, à l'inverse des autres formes de diabète pour lesquelles on ne connaît que des gènes de prédisposition multiples, insuffisants à eux seuls pour provoquer la maladie. Le diabète de type *Mody* a été initialement défini par un diabète de survenue précoce (classiquement avant l'âge de 25 ans), non insulino-dépendant, au moins dans les premières années suivant le diagnostic, survenant suite à une transmission autosomique dominante, ce qui signifie qu'il atteint statistiquement la moitié des sujets de chaque génération d'une famille dans les deux sexes.

Le *diabète de type 3* est une maladie systémique qui apporte une destruction du pancréas. Cette pathologie peut être causée par des pancréatites chroniques, certaines réactions défavorables à des médicaments ou à un défaut familial typique de certains récepteurs responsables de l'efficacité de l'insuline. Il faut noter que le diabète de type 3 est beaucoup plus rare.

*Cytokines, adipokines
et système immunitaire*

Chapitre II

CHAPITRE 2

Cytokines, adipokines et système immunitaire

2. 1. Le tissu adipeux : une glande endocrine

2. 1. 1. Notions générales

Pendant longtemps, le tissu adipeux a été considéré comme un tissu de « stockage » emmagasinant les graisses en période d'abondance et les relarguant lors de périodes de jeûne.

Actuellement, il est clairement établi que le tissu adipeux est aussi capable de sécréter de nombreuses molécules de nature peptidique ou non peptidique, dotées de propriétés régulatrices (Ahima and Flier, 2000; Guerre-Millo, 2002) : les adipokines. C'est le cas de la leptine, hormone impliquée dans le contrôle de l'homéostasie énergétique; du TNF- α « *tumor necrosis factor- α* », de l'IL-6 « *interleukine- 6* » et de la résistine, cytokines potentiellement impliquées dans l'insulino-résistance et l'inflammation; du TGF- β « *transforming growth factor- β* », facteur angiogénique ubiquitaire; des protéines de la voie alterne du complément...

Toutes ces molécules sont regroupées sous le terme d'adipocytokines suite à leur similitude structurelle avec les cytokines « classiques ». Certaines de ces molécules agissent par voie endocrine et sont de véritables hormones (leptine, adiponectine...), d'autres agissent plus localement par voie autocrine ou paracrine (TNF α , facteurs angiogéniques...).

Cette fonction sécrétoire du tissu adipeux le place au centre d'un réseau le connectant au contrôle de l'homéostasie énergétique, au métabolisme glucidique et lipidique, aux réponses immunitaires et aux fonctions de reproduction (**Figure 3**).

Virtuellement tous les facteurs sécrétés par le tissu adipeux vont être modifiés lors de variations de masse grasse, qu'il s'agisse d'augmentation (obésité) ou de diminution anormale (cachexie, lipoatrophie). Ces facteurs vont ainsi jouer un rôle dans l'étiopathogénie ou les complications de l'obésité, de la cachexie et de la lipoatrophie.

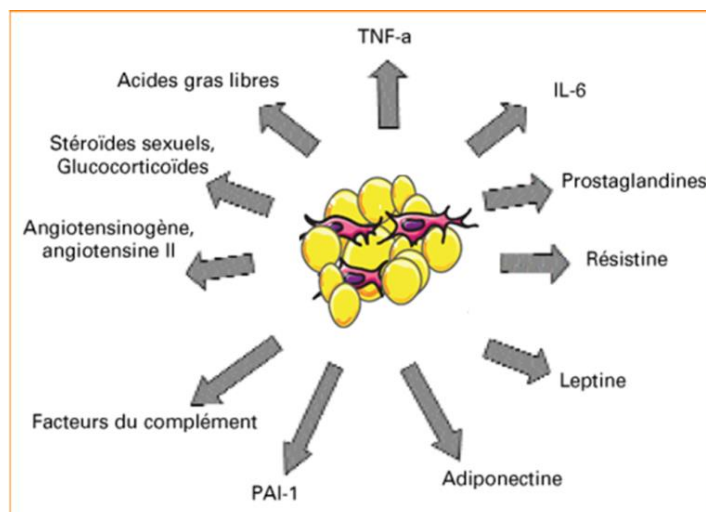


Figure 3: Le tissu adipeux est capable de sécréter de nombreuses molécules de nature peptidique ou non peptidique : les adipokines. C'est le cas de la leptine, TNF- α , de l'IL-6 et de la résistine.....

Figure 3: L'adipocyte : une cellule endocrine (Ben Sahra et coll., 2008).

2. 1. 2. Adipokines et cytokines : différences, similitudes et relations

2. 1. 2.1. Les adipokines

Comme le nombre des protéines sécrétées par le TA ne cesse d'augmenter, il est devenu primordial de leur accorder un nom collectif (Trayhurn and Wood, 2004). Le terme introduit et couramment utilisé au début est « adipocytokines » (Funahashi et coll., 1999). Mais, comme la majorité des protéines sécrétées par les TA ne sont ni des cytokines, ni ne s'y apparentent « *cytokine-like* », il a été recommandé d'adopter universellement la dénomination « adipokine » pour définir une protéine sécrétée par le TA (Trayhurn and Wood, 2004). Le terme « adipokine » est utilisé en général pour définir l'ensemble des molécules (cytokines ou non) sécrétées par le TA, et non seulement par les adipocytes puisque les macrophages qui infiltrent ce tissu sont responsables de la sécrétion d'un bon nombre de ces adipokines (Weisberg et coll., 2003).

Le nombre total d'adipokines répertoriées, à la fois documentées et spéculées dépasse la cinquantaine. Bon nombre de ces adipokines sont impliquées dans la réponse immunitaire et dans l'inflammation ainsi que dans les interactions entre les adipocytes et le système immunitaire (Pond, 2005). La diversité des adipokines est considérable, en termes de structure de protéine et de fonction. Les adipokines englobent des cytokines pro-inflammatoires telles que (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), des chimiokines telles que la Protéine Chémoattractrice des Monocytes de type 1 (MCP-1), les protéines du système de complément alternatif (ex, adiposine), les protéines impliquées dans l'homéostasie vasculaire (ex, Inhibiteur de l'Activateur de plasminogène-1 (PAI-1)), dans la pression artérielle (angiotensinogène), le métabolisme des lipides (ex, protéine de transfert des esters de cholestérol, protéine de liaison du rétinol), l'homéostasie du glucose (ex, adiponectine), la prise alimentaire (leptine) et

l'angiogenèse Facteur Endothélial Vasculaire de Croissance (VEGF) (Trayhurn and Wood, 2004).

2. 1. 2.2. Les cytokines

Les cytokines ont été décrites par (McDermott, 2001) comme des protéines pharmacologiquement actives avec une masse moléculaire relativement faible (8 à 30 kDa) agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Elles sont généralement sécrétées par les cellules du système immunitaire dont le but est de modifier ses propres fonctions (effet autocrine) ou celles des autres cellules adjacentes (effet paracrine). Ces cytokines exercent des activités biologiques multiples surtout dans l'inflammation et la réponse immunitaire (Coppack, 2001). Plus de 200 ligands de cytokines ont été identifiés et regroupés sous plusieurs familles comme :

- **Les interférons (IFN)**, découverts en 1957 et connus pour leur activité antivirale. Il en existe trois isoformes $-\alpha$, $-\beta$ et $-\gamma$.
- **Les interleukines (IL)**. Il s'agit de cytokines regroupées sous cette terminologie sans parenté biochimique ni de fonction, mais classées par commodité au gré des découvertes. Le terme a été créé en 1979 à une époque où seulement deux interleukines étaient connues (IL-1 et IL-2).
- **Les chimiokines**. Ce terme définit l'ensemble des cytokines de très faible poids moléculaire, ayant toutes en commun un pouvoir chimiotactique.
 - ♦ La famille du facteur de nécrose tumorale (**TNF**). Des membres issus d'un gène ancestral commun pouvant aussi être à la surface des cellules comme TNF ($-\alpha$, $-\beta$).
 - ♦ Les facteurs de stimulation des colonies (**CSF**). Il s'agit de cytokines jouant un rôle dans l'hématopoïèse, mais aussi pouvant activer les leucocytes matures.
 - ♦ Les facteurs de croissance transformant (**TGF**). Ce sont des facteurs de croissance impliqués dans la cicatrisation et le contrôle négatif de l'inflammation.

Très nombreuses sont les différentes formes d'adipokines qui ont été isolées, et nous nous limiterons dans ce chapitre à ceux d'entre eux qui ont une relation directe ou indirecte avec le métabolisme glucidique et inflammatoire.

2. 1. 3. L'adiponectine

L'adiponectine, c'est une adipokine fortement exprimée dans le tissu adipeux, qui a été identifiée en 1995 (Scherer et coll., 1995). Elle est connue sous plusieurs noms ACRP30 « *Adipocyte Complement-Related Protein of 30 kDa* » ou adipoQ chez la souris et GBP28 « *Gelatin-Binding Protein 28* » ou APM1 « *AdiPose Most abundant gene transcript 1* » chez l'homme (Kadowaki and Yamauchi, 2005).

A/-Structure

C'est une protéine composée de 4 domaines : une séquence de signal sur la région amine terminale suivie d'une région variable sans spécificité, d'un domaine collagène et d'un domaine globulaire carboxyle terminal (Kadowaki and Yamauchi, 2005). Le domaine C-terminal est doté de l'essentiel de l'activité biologique de l'hormone. L'adiponectine se retrouve dans le plasma sous diverses formes moléculaires : une forme monomérique de 30kDa et une forme multimérique (**Figure 4**). Une forme globulaire issue d'une protéolyse a été détecté dans le plasma humain (Hug and Lodish, 2005).

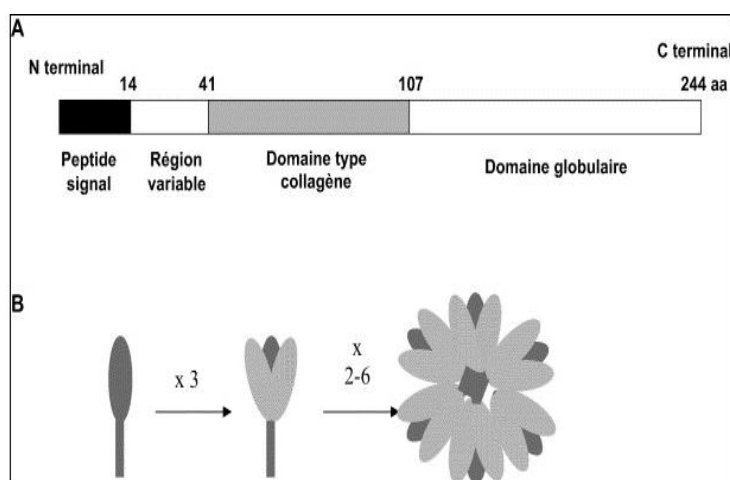


Figure 4 : (A) Structure primaire de l'adiponectine. Présente 4 domaines : une séquence de signal sur la région amine terminale suivie d'une région variable sans spécificité, d'un domaine collagène et d'un domaine globulaire carboxyle terminal. (B) Formes circulantes.

Figure 4: Structure primaire (A) et diverses formes circulantes (B) de l'adiponectine (Kim et coll., 2006).

B/-Biosynthèse

L'adiponectine est majoritairement sécrétée par le tissu adipeux (adipocytes), mais aussi par des cellules non adipeuses comme les ostéoblastes (Whitehead et coll., 2006), et compte pour 0,01% des protéines plasmatiques totales chez l'humain (Hopkins et coll., 2007).

Sa concentration sérique normale se situe entre 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ (Matsuzawa, 2006). Sa synthèse est régulée par plusieurs mécanismes faisant intervenir d'autres molécules. Par exemple, l'insuline et l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) l'augmentent (Stefan and Stumvoll, 2002), alors que les glucocorticoïdes et le TNF- α la diminuent. Les concentrations plasmatiques sont plus élevées chez la femme que chez l'homme.

C/-Mode d'action

Deux récepteurs à l'adiponectine ont été identifiés en 2003. AdipoR1 et adipoR2 ont une expression ubiquiste et sont exprimés par la prostate et le côlon chez l'homme (Michalakis et coll., 2007). AdipoR1 et adipoR2 sont exprimés dans de nombreux tissus et médient l'action de l'adiponectine *via* l'activation de la voie AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Cette voie *via* la protéine TSC₂ (*tuberous sclerosis complex 2*) va alors inhiber la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) impliquée dans la synthèse protéique et la croissance cellulaire (Inoki, Zhu, and Guan, 2003). Plusieurs études ont montré que l'adiponectine inhibe la prolifération de cellules endothéliales et de cellules de muscles lisses en interagissant avec des facteurs de croissance cellulaire comme le FGF ou l'EGF ou bien en induisant l'apoptose (Arita et coll., 2002).

D/-Effet biologique

De plus, les niveaux plasmatiques d'adiponectine dépendent de la quantité de la masse grasse et sont plus bas chez les patients diabétiques que chez les non diabétiques (Scherer et coll., 1995), ce qui suggère un **lien avec l'obésité et le diabète**. Cependant, à l'inverse des autres adipokines, les concentrations d'adiponectine sont diminuées chez les individus obèses (Lafontan and Viguerie, 2006). D'une manière générale, les concentrations plasmatiques d'adiponectine sont inversement proportionnelles à l'importance de la masse grasse, mais sont positivement corrélées à la sensibilité à l'insuline (Berg, Combs, and Scherer, 2002; Stefan et coll., 2002). Ainsi en cas d'obésité, la diminution des taux d'adiponectine induit une insulino-résistance, laquelle peut être corrigée par l'administration d'adiponectine (Yamauchi et coll., 2001).

Il est intéressant de remarquer que la réduction pondérale chez l'obèse qui produit une amélioration de la sensibilité à l'insuline s'accompagne de manière concomitante d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'adiponectine (Yang et coll., 2001). Ces observations suggèrent donc que l'adiponectine améliore la sensibilité à l'insuline.

Il est également à relever que les facteurs qui, au contraire, induisent l'insulino-résistance, comme le TNF- α et les glucocorticoïdes, inhibent l'expression du gène de l'adiponectine (Fasshauer et coll., 2002; Halleux et coll., 2001; Stefan and Stumvoll, 2002).

Il apparaît donc que l'adiponectine joue un rôle physiologique essentiel dans la sensibilité à l'insuline. Ce rôle de sensibilisateur des effets de l'insuline a d'ailleurs très récemment été confirmé par l'observation que l'adiponectine stimule la phosphorylation des résidus tyrosine du récepteur à l'insuline (Stefan et coll., 2002) et amplifie de manière

importante l'action de l'insuline aussi bien au niveau du muscle que du foie (Berg, Combs, and Scherer, 2002).

En plus de l'effet sur le métabolisme du glucose, l'adiponectine agit aussi sur les graisses. Elle stimule l'oxydation musculaire des acides gras, elle diminue les concentrations d'acides gras libres et de triglycérides et produit une réduction de la masse grasse de l'organisme sans que les apports alimentaires ne soient modifiés (Fruebis et coll., 2001). Finalement, l'adiponectine a également un effet anti-athérogène grâce à une action anti-inflammatoire au niveau de la paroi des vaisseaux (Yang et coll., 2001).

Bien que de nombreuses questions demeurent, cette molécule des plus intéressantes paraît jouer un rôle de premier ordre (en raison de sa sécrétion insuffisante) dans les troubles associés à l'obésité et au diabète de type 2 et pourrait donc avoir un avenir thérapeutique spectaculaire.

2. 1. 4. La leptine

La leptine, c'est une adipokine qui a été isolée par Zhang et coll. en 1994 (Zhang et coll., 1994)

A/-Structure

C'est une hormone de nature protéique constituée de 146 acides aminés de poids moléculaire 16 kDa produite de façon prédominante par les tissus adipeux, de structure similaire aux IL-6 et IL-12.

B/-Biosynthèse

Le rôle endocrine du tissu adipeux est surtout connu grâce à la découverte de la leptine. Elle est principalement exprimée dans le tissu adipeux (Adipocyte) bien qu'elle soit également produite en plus faible quantité dans d'autres organes comme le placenta, le muscle et le cerveau. Son rôle essentiel est le contrôle de l'appétit et de la régulation de la prise alimentaire (La Cava and Matarese, 2004). Sa sécrétion est proportionnelle à la masse de tissu adipeux et ses effets sont principalement centraux : la liaison de la leptine sur son récepteur hypothalamique réduit la prise alimentaire et modifie le tonus du système nerveux autonome, agissant ainsi sur la sécrétion de l'insuline, la production hépatique de glucose et le métabolisme glucolipidique musculaire (Harris, 2000; Rayner and Trayhurn, 2001).

C/-Mode d'action

Le récepteur de la leptine est exprimé de façon ubiquiste et possède plusieurs isoformes issues d'épissages alternatifs du gène Ob-R (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Re) qui

varient par la longueur de leur domaine transmembranaire. Les deux principales isoformes Ob-Ra et Ob-Rb sont exprimées ubiquitairement chez l'homme (Hoggard et coll., 1997).

Le récepteur de la leptine appartient à la famille des récepteurs de cytokines de classe I, il ne possède pas d'activité tyrosine-kinase intrinsèque. Il requiert l'activité de la Janus kinase (JAK) qui initie la signalisation intracellulaire *via* plusieurs voies de transduction intracellulaires : les protéines de la famille STAT (*signal transducers and activators of transcription*) (Baumann et coll., 1996), la voie des MAPK (*mitogen activated protein kinases*), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) *via* un domaine SH2 localisé dans la partie intracellulaire du récepteur (Banks et coll., 2000), les voies PI3-K (*phosphatidyl-inositol-3-kinase*) et JNK (*c-jun NH2-terminal-kinase*) (Onuma et coll., 2003). Ces voies de signalisation jouent non seulement un rôle clef dans la croissance cellulaire et dans la transformation maligne, mais aussi dans le développement de l'obésité et du diabète (Bost et coll., 2005a; Bost et coll., 2005b).

Comme il existe des récepteurs de la leptine fonctionnels au niveau des tissus périphériques insulino-sensibles, une action directe de cette hormone a été suggérée, mais les résultats des études sont contradictoires. Il semble cependant que la leptine, tout comme l'adiponectine, soit capable de stimuler la MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinase et agir ainsi sur la concentration musculaire du malonyl-CoA et sur l'oxydation des acides gras. ***Le rôle clef de la leptine est la régulation de l'homéostasie énergétique.*** Elle fonctionne en donnant un signal négatif pour le stockage des lipides. La leptine est une forme de lipostat : en réponse à l'augmentation des réserves adipeuses, elle provoque l'arrêt de la prise alimentaire et augmente les dépenses énergétiques, exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif sur la masse adipeuse (Ailhaud, 2006). Par ailleurs, la sécrétion de la leptine est plus importante dans le TA sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral et la concentration circulante élevée de cette hormone trouvée chez les femmes est probablement relative à une proportion, plus élevée, de TA sous-cutané (Ahima and Flier, 2000). La leptine joue encore un rôle dans l'immunité en stimulant la sécrétion des IL-12, IL-6 et TNF- α dans les macrophages et dans les monocytes (Gainsford et coll., 1996).

D/-Effet biologique

Les concentrations de leptine circulantes mettent en évidence une corrélation positive avec la graisse corporelle, ainsi la leptinémie est élevée chez les individus obèses comparés aux personnes minces (Considine et coll., 1996). Elle joue un rôle majeur au niveau de l'hypothalamus en régulant la prise alimentaire (Friedman, 2000). Elle est également impliquée

dans les fonctions reproductrices (Bajari, Nimpf, and Schneider, 2004), l'hématopoïèse (Bennett et coll., 1996), l'angiogenèse (Bouloumie et coll., 1998) et dans le développement osseux (Thomas, 2004).

Le rôle clef de la leptine est la régulation de l'homéostasie énergétique. Elle fonctionne en donnant un signal négatif pour le stockage des lipides. La leptine est une forme de lipostat : en réponse à l'augmentation des réserves adipeuses, elle provoque l'arrêt de la prise alimentaire et augmente les dépenses énergétiques, exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif sur la masse adipeuse (Ailhaud, 2006).

Par ailleurs, la sécrétion de la leptine est plus importante dans le TA sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral et la concentration circulante élevée de cette hormone trouvée chez les femmes est probablement relative à une proportion, plus élevée, de TA sous-cutanée (Ahima and Flier, 2000).

La leptine joue encore un rôle dans l'immunité en stimulant la sécrétion des IL-12, IL-6 et TNF- α dans les macrophages et les monocytes (Gainsford et coll., 1996). En effet, la leptine est capable de moduler la réponse du système immunitaire, puisqu'elle module les réponses immunes pro-inflammatoires en augmentant la phagocytose ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires (Loffreda et coll., 1998).

Ainsi, la leptine, dont la production est stimulée durant les phénomènes inflammatoires, semble participer à la cascade des cytokines qui sont activées lors d'une infection et d'une blessure.

L'hypothèse que la leptine joue un rôle important dans la phase aiguë de l'infection est démontrée par l'observation récente qu'un déficit en leptine s'accompagne, d'une part, d'une augmentation de la létalité lors d'administration d'endotoxines et, d'autre part, d'une diminution de l'induction des cytokines anti-inflammatoires (Faggioni et coll., 1999). Ainsi, un déficit en leptine serait un facteur aggravant lors d'infections, comme si la leptine avait un rôle protecteur. Cette spéculation s'est avérée exacte puisque l'administration de leptine à des souris qui n'en produisent pas diminue de manière très importante la mortalité liée à l'administration d'endotoxines.

2. 1. 5. Le facteur de nécrose tumorale alpha

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'interleukine 6 (IL-6) sont des cytokines identifiées à l'origine comme des molécules pro-inflammatoires.

La famille des cytokines du TNF tient son nom de l'anglais « *tumor necrosis factor* ». Ayant une action pléiotrope, TNF- α est un médiateur majeur au cours des réactions inflammatoires et immunitaires. Elle comprend le TNF- α et les lymphotoxines α et β (TNF- β).

A/-Structure

C'est une glycoprotéine, constituée de 35 acides aminés (AA) cytoplasmiques, 21 AA transmembranaires, et 177 extracellulaires. Le TNF- α s'assemble en trimère dans la membrane et ces AA sont obtenus par clivage d'un précurseur de 212 acides aminés se trouvant à la surface de macrophages ou de fibroblastes. Génétiquement, le TNF provient du chromosome 7p21 chez les humains.

La structure globale du TNF- α est décrite comme un sandwich formé de deux feuillets bêta antiparallèles, eux-mêmes constitués de 8 brins antiparallèles. Des ponts disulfures lient les monomères afin de stabiliser la structure, mais ils ne sont pas nécessaires à l'activité biologique.

L'extrémité C-terminale est à l'intérieur du sandwich alors que l'autre (N-terminale) est libre à l'extérieur.

B/-Biosynthèse

Il est sécrété par les macrophages et à un moindre degré par les lymphocytes T activés (TH1) (Figure 5).

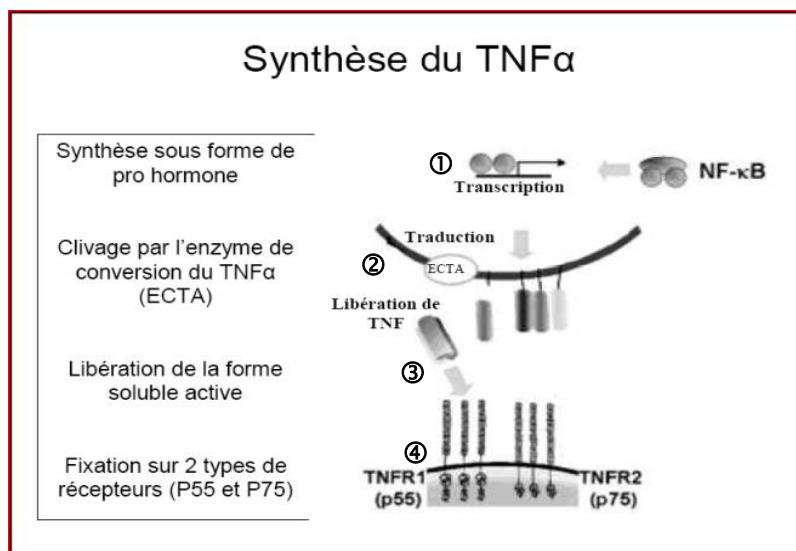


Figure 5: ① Synthèses du TNF α sous formes de pro hormone. ② Clivage par l'enzyme de conversion du TNF α . ③ Libération de la forme soluble active. ④ Fixation du TNF α sur 2 types de récepteurs (P55 et P75).

Figure 5: Synthèse du TNF- α .

Le TNF α est libéré par les leucocytes, l'endothélium et d'autres tissus généralement en réponse à un dommage, par exemple une infection. Sa libération est stimulée par plusieurs autres médiateurs, comme l'interleukine 1. Il possède plusieurs actions sur divers organes et systèmes, généralement en coopération avec les interleukines 1 et 6 (Brousse, 2003):

- sur le foie : stimulation de la phase de réponse aiguë, conduisant à une augmentation de CRP (C-Réactive Protéine) et d'autres médiateurs ;
- il attire très efficacement les polynucléaires neutrophiles, et les aide à adhérer à la paroi des cellules endothéliales, d'où elles sortiront par diapédèse ;
- sur les macrophages : stimulation de la phagocytose, production d'IL-1, d'oxydants et de lipides pro-inflammatoires, de la prostaglandine E2 (PGE2) ;
- autres tissus : augmentation de la résistance à l'insuline.

Une augmentation locale de la concentration en TNF- α cause les signes cardinaux de l'inflammation : *Rubor* (rougeur, érythème), *Calor* (chaleur, due à la vasodilatation), *Tumor* (tuméfaction, œdème), *Dolor* (douleur), *Functio laesa* (atteinte de la fonction du membre ou de l'organe, signe plus inconstant).

C/-Mode d'action

On dénombre deux formes de TNF- α : une soluble et une liée à la membrane. Ces deux formes sont actives mais ont des affinités différentes pour les récepteurs de la TNF qui sont eux mêmes de deux types :

- membranaires (à la surface des cellules). Lorsque le TNF- α s'y fixe, la cellule est activée ;
- solubles (TNFR-1 (p75) et TNFR-2 (p55)) : ceux-ci sont une forme de transport du TNF- α . Lorsqu'il s'y fixe, il ne peut interagir avec les cellules et devient donc inactif (Brousse, 2003). Ces récepteurs sont à l'origine d'une régulation naturelle de l'activité biologique du TNF- α (**Figure 6**). TNFR-1: lie le TNF- α et possède un domaine de mort impliqué dans le recrutement des capsases. TNFR-2 : lie le TNF- α .

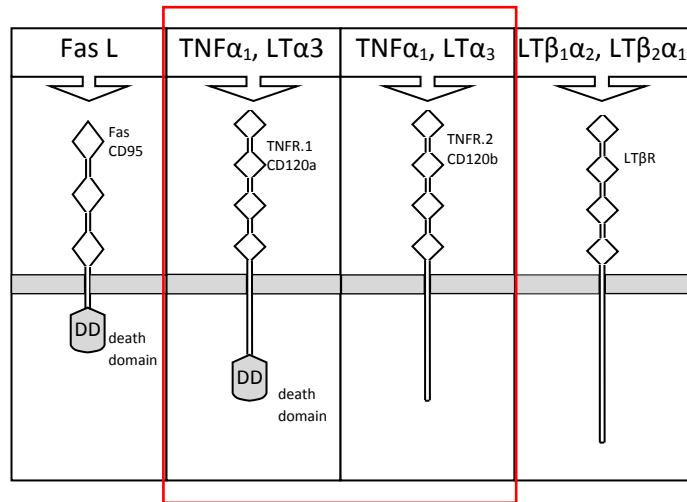


Figure 6 : La famille moléculaire du récepteur du TNF-α.

Le TNF-α peut induire la mort cellulaire ou son activation selon le récepteur sur lequel il se lie. Les récepteurs solubles du TNF-α, tronqués de leur partie transmembranaire, sont présents en forte concentration dans le sérum (1000 fois plus que le TNF-α). Ils ont un effet antagoniste du TNF-α.

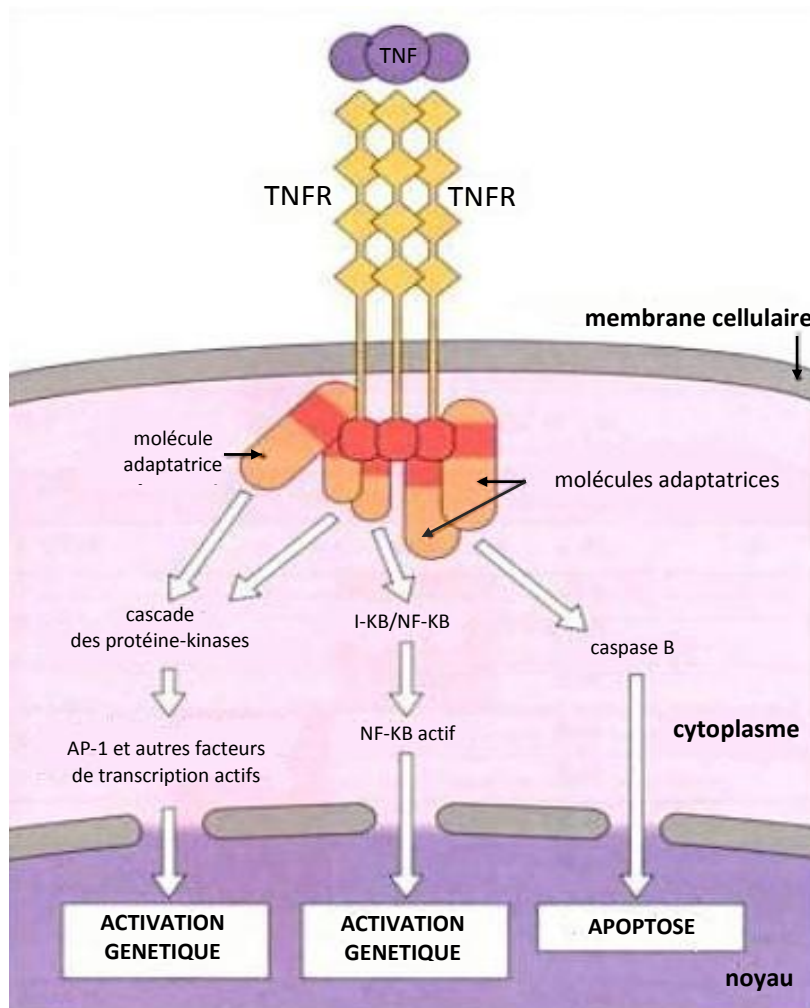


Figure 7: Les voies de signalisation cellulaire induite par le TNF- α .

Le TNF en se fixant sur son récepteur membranaire induit sa trimérisation. Le trimère de TNFR recrute alors des molécules adaptatrices qui vont activer le facteur de transcription NF- κ B qui empêche l'apoptose, sauf si la cellule est infectée par un virus ou soumise à l'influence d'autres cytokines en simultané (**Figure 7**). En action avec la lymphotoxine, il peut induire l'apoptose. Les domaines cytoplasmiques de certains récepteurs de la famille du TNF ont un domaine létal. Il peut recruter lorsqu'il est activé d'autres protéines cytoplasmiques ayant ce domaine. La voie de la caspase 8 peut alors être déclenchée. La caspase 8 induit une cascade de protéases qui amèneront à la mort cellulaire par apoptose.

D/-Effet biologique

Le TNF- α entre en jeu dans de nombreux processus. L'image ci-dessous (**Figure 8**) dresse un aperçu des fonctions que cette molécule peut tenir.

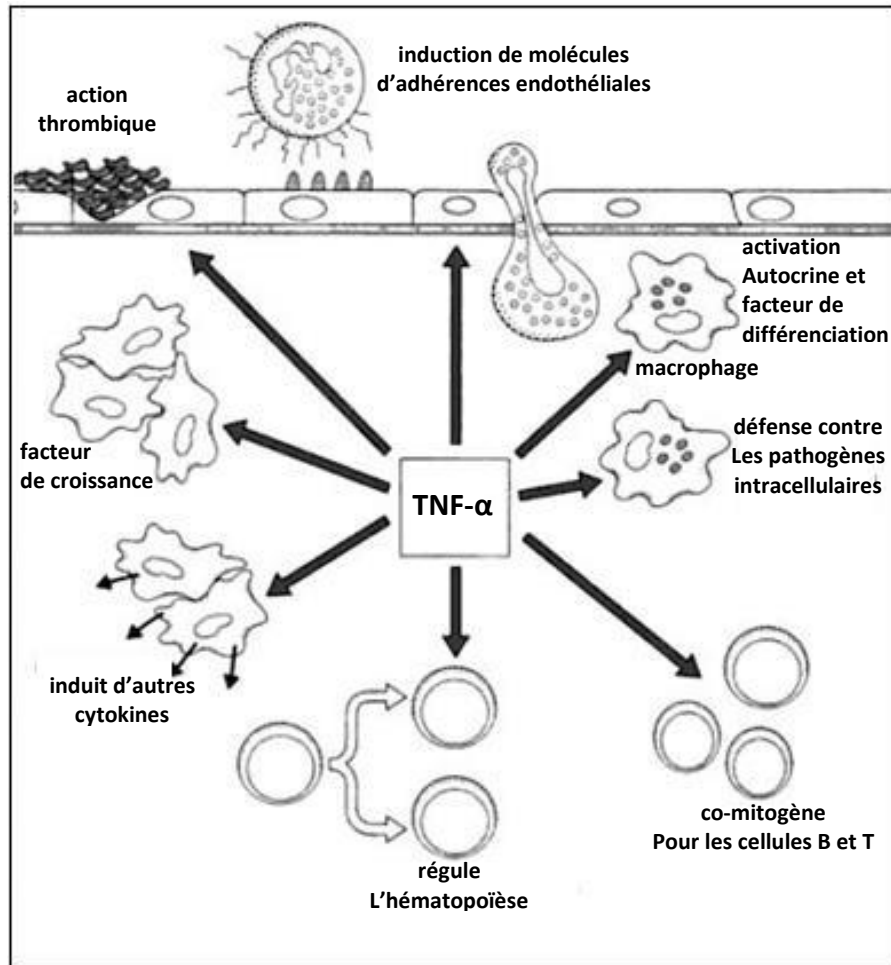


Figure 8: TNF- α exerce plusieurs fonctions dans le mécanisme de l'inflammation. •Il favorise la thrombose, •l'adhérence des leucocytes et leur migration. •La régulation de l'activation des macrophages et les réponses immunitaires dans les tissus. •Il module aussi l'hématopoïèse et le développement lymphocytaire.

Figure 8: Modifications déclenchées par TNF- α .

Le TNF- α exerce plusieurs fonctions dans l'inflammation. Il favorise la thrombose, l'adhérence des leucocytes et leur migration. Il a un rôle important dans la régulation de l'activation des macrophages et les réponses immunitaires dans les tissus. Il module aussi l'hématopoïèse et le développement lymphocytaire.

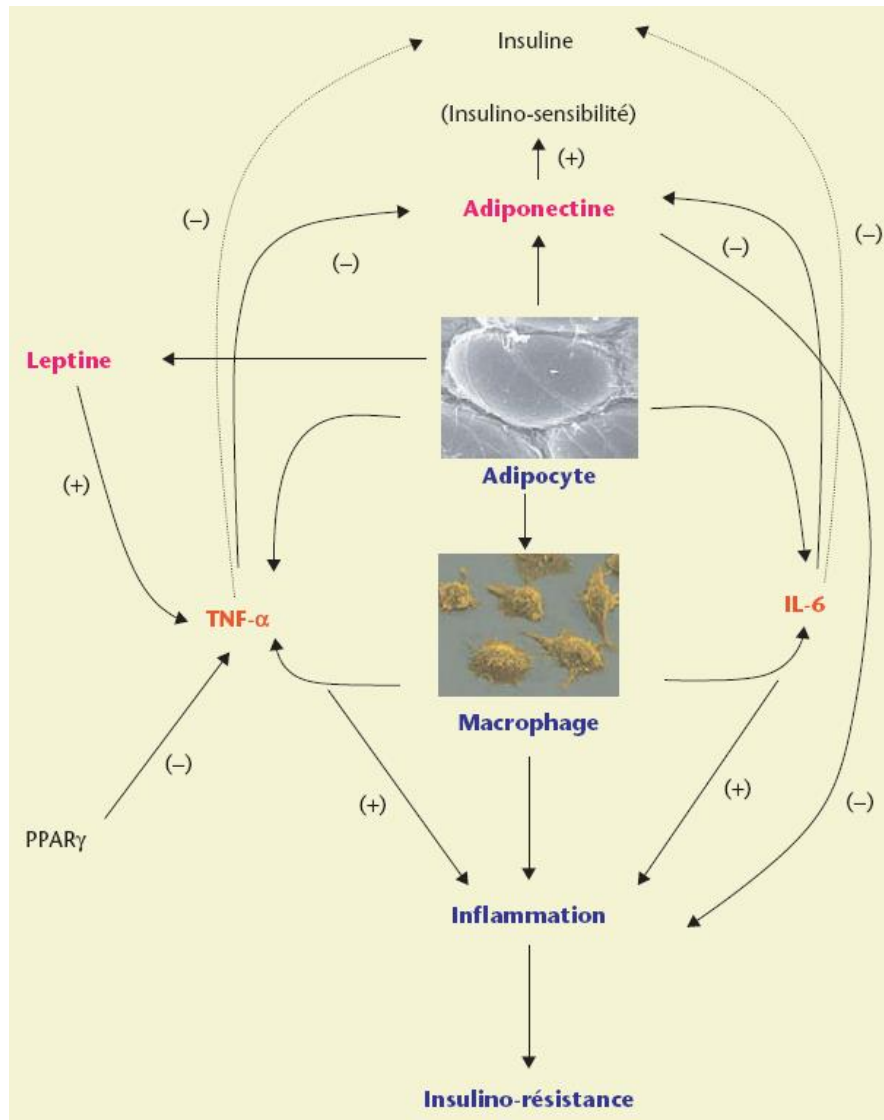


Figure 9 : Sécrétion des cytokines et des adipokines, et leurs implications dans l'insulino-résistance. Les adipocytes sécrètent les adipokines (adiponectine et leptine) et les cytokines pro-inflammatoires, libérées aussi par les macrophages, qui favorisent l'inflammation. La leptine contribue à l'inflammation en augmentant la sécrétion du TNF α . Cependant, le PPAR γ diminue le taux de cette cytokine pro-inflammatoire. Le TNF α et l'IL-6 antagonisent avec l'action de l'insuline et diminuent la sécrétion de l'adiponectine qui a une action insulino-sensibilisante. (+), effet inducteur ; (-), effet inhibiteur.

Figure 9: Sécrétion des cytokines et des adipokines, et leurs implications dans l'insulino-résistance (Khan, 2006).

2. 1. 6. L'interleukine 6 : IL-6

A/-Structure

L'IL-6 humaine, de masse molaire 26 000 Da, est une glycoprotéine de 184 acides aminés (aa). Le précurseur est constitué de 212 aa. Il existe deux sites de N-glycosylation (résidus 45 et 144) et de nombreux sites de O-glycosylation. Il y a quatre cystéines (**Figure 10**) formant 2 ponts disulfures (Cys 45–Cys 51 et Cys74–Cys 84). Le gène de l'IL-6 est présent sur le chromosome 7 humain (7p21), constitué de 5 exons. De nombreux sites de régulation de la transcription ont été identifiés en amont du gène de l'IL-6 (Gaillard, 2002).

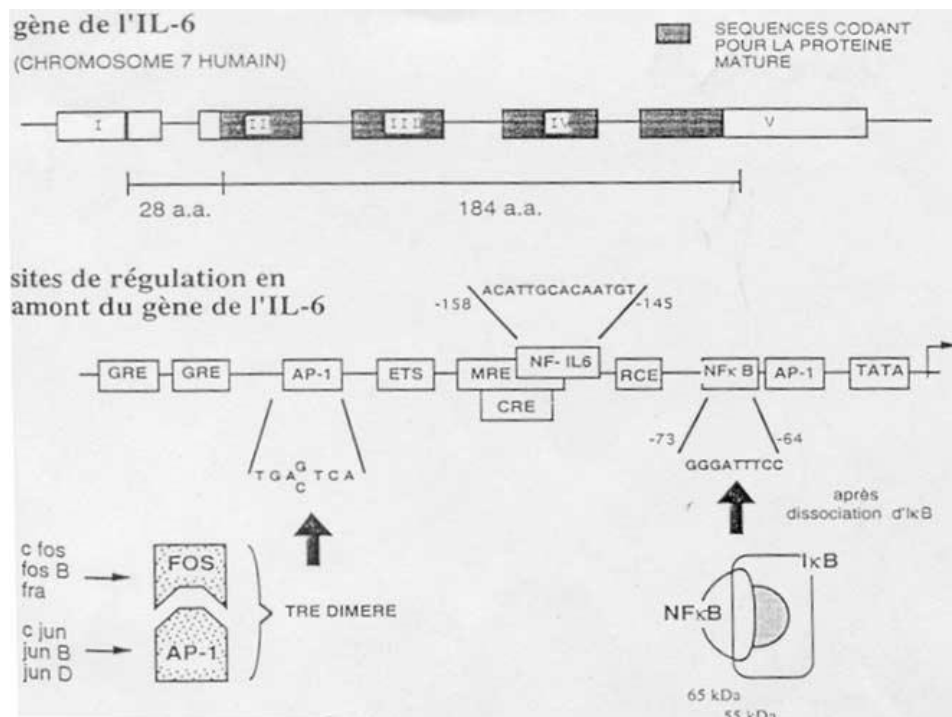


Figure 10: Représentation schématique du gène de l'IL-6 humaine et des gènes de régulation en amont de celui-ci (Gaillard, 2002).

B/-Biosynthèse

Lors d'une activation, de nombreuses cellules peuvent produire de l'IL-6 : monocytes/macrophages, lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, fibroblastes, neutrophiles, mastocytes, astrocytes, chondrocytes, progéniteurs hématopoïétiques, éosinophiles, cellules endothéliales, épidermiques...

L'IL-6 est très souvent produite sous l'effet d'autres cytokines. Ainsi, l'IL-1 et les TNF- α et induisent la production d'IL-6 par les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes. L'endothéline active la production d'IL-6 par les cellules endothéliales et les cellules stromales. Le lipopolysaccharide (LPS) est également un puissant inducteur d'IL-6 pour les monocytes/macrophages, les fibroblastes et les lymphocytes B. Les lymphocytes T (Th0, Th2) sous l'influence de mitogènes produisent de l'IL-6. Les lymphocytes T produisent de l'IL-6 lors d'une infection par HTLV-1 et les lymphocytes B lorsqu'ils sont mis en présence du VIH. L'IL-4 active la sécrétion d'IL-6 par les lymphocytes B et les cellules endothéliales. C'est au contraire un effet inhibiteur que possède cette même IL-4 sur la production d'IL-6 par les monocytes/macrophages activés. Comme pour d'autres cytokines, il semble que les cellules épithéliales thymiques produisent spontanément de l'IL-6. Environ 30% de l'IL-6 sécrétée sont issue du tissu adipeux. L'IL-6 plasmatique croît proportionnellement avec le développement de

l'obésité (Mohamed-Ali et coll., 1997), et les études épidémiologiques en font un facteur de risque d'athérosclérose.

C/-Mode d'action

Le récepteur de l'IL-6 fait partie de la famille des récepteurs des cytokines de classe I, qui recrutent les Janus Kinases (JAK) pour transduire le signal intracellulaire (Ihle et coll., 1995). L'activation des JAK entraîne la phosphorylation de facteurs de transcription de la famille des STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), ce qui permet leur dimérisation (**Figure 11**), leur activation et leur translocation dans le noyau, où ils vont affecter la transcription de gènes cibles (Ihle et coll., 1995).

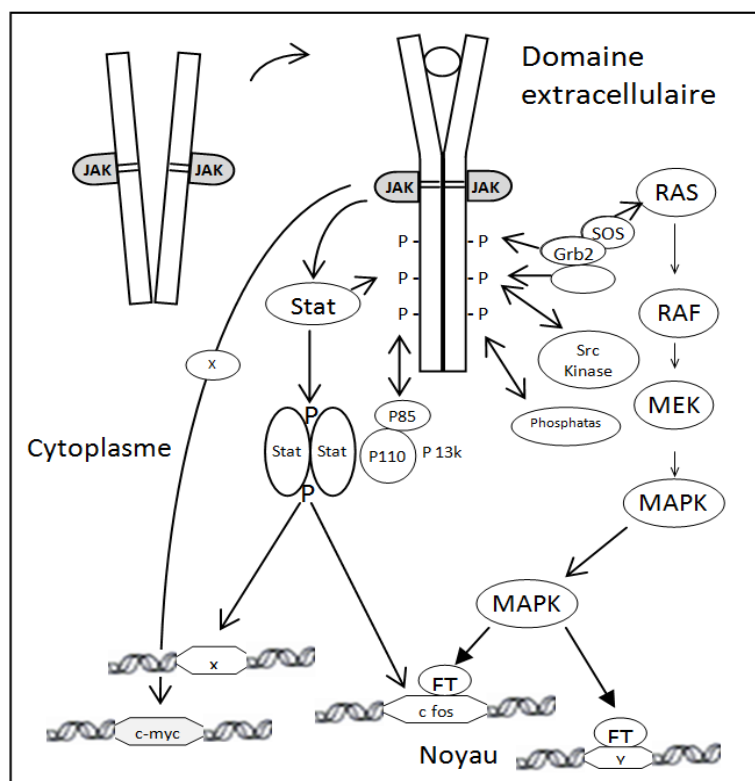


Figure 11: Le récepteur de l'IL-6 (classe I), recrute les Janus Kinases (JAK) pour transduire le signal intracellulaire. L'activation des JAK entraîne la phosphorylation de facteurs de transcription de la famille des STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), ce qui permet leur dimérisation, leur activation et leur translocation dans le noyau, où ils vont affecter la transcription de gènes cibles.

Figure 11: Mécanisme d'action intracellulaire des récepteurs d'IL-6 (Françoise, 1998).

D/-Effets biologiques

L'IL-6 stimule la production des anticorps par les plasmocytes et la synthèse des protéines de phase aiguë par les hépatocytes. Ces cytokines ont une action autocrine (dirigée vers les cellules sécrétrices), paracrine (vers les cellules voisines) et endocrine (**Figure 12**). Leurs actions autocrine et paracrine prédominent sur leur effet endocrine, ce dernier s'observant surtout en cas d'hypersécrétion (comme c'est le cas dans l'obésité).

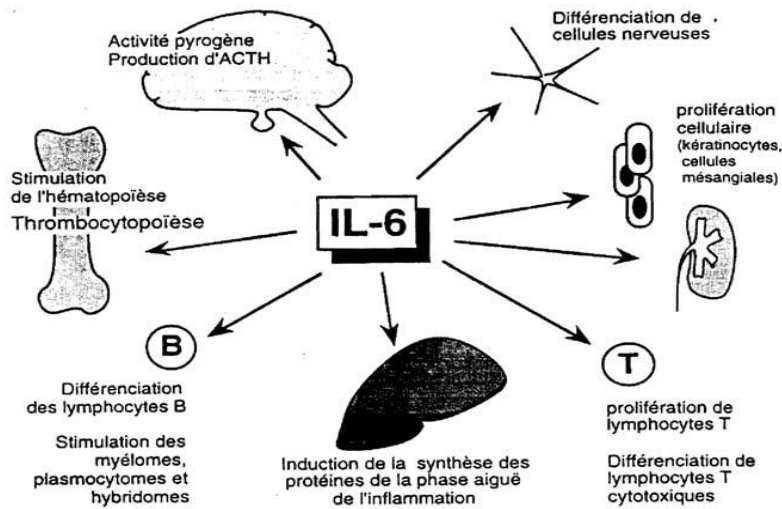


Figure 12: Résumé schématique des activités de l'IL-6 (Gaillard, 2002).

Conclusion

Le tissu adipeux constitue la plus grande réserve d'énergie de l'organisme. La mobilisation de cette énergie est contrôlée par des signaux hormonaux provenant de divers organes. Il est actuellement bien établi que le tissu adipeux constitue un véritable organe endocrine très actif qui joue un rôle déterminant aussi bien dans la régulation de la balance énergétique que dans les mécanismes physiopathologiques des nombreuses co-morbidités associées à l'obésité (**Figure 13**).

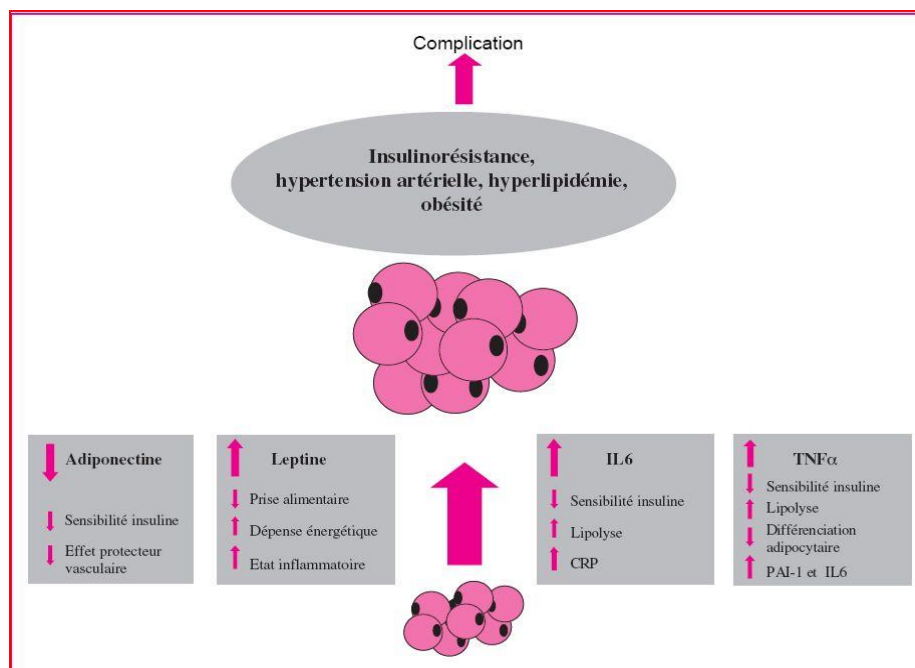


Figure 13: Le développement du tissu adipeux s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires qui peuvent participer aux complications (Trayhurn and Wood, 2004).

2. 2. Le système immunitaire

Notre organisme est peuplé de nombreux micro-organismes : virus, bactéries, levures, protozoaires et parasites multicellulaires. Après infection, ces micro-organismes peuvent provoquer des maladies qui, dans certains cas, conduisent à la mort s'ils se multiplient de façon incontrôlée. Cependant, la plupart des infections guérissent rapidement et laissent peu de séquelles. Ceci est dû au système immunitaire qui combat et protège notre organisme des agents infectieux.

Le système immunitaire est un réseau complexe de cellules et molécules interactives qui sont impliquées dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Le rôle du système immunitaire est de reconnaître, contrôler, et éliminer efficacement ces agents pathogènes.

Le système immunitaire de l'Homme comme des Vertébrés supérieurs repose sur deux piliers,

- **l'immunité spécifique** constituée des lymphocytes T et B, de cinétique lente mais douée de mémoire
- et **l'immunité innée** où participent de nombreuses cellules hématopoïétiques (polynucléaires, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques, lymphocytes NK), de déclenchement rapide sans mémorisation des expériences passées (**Figure 14**).

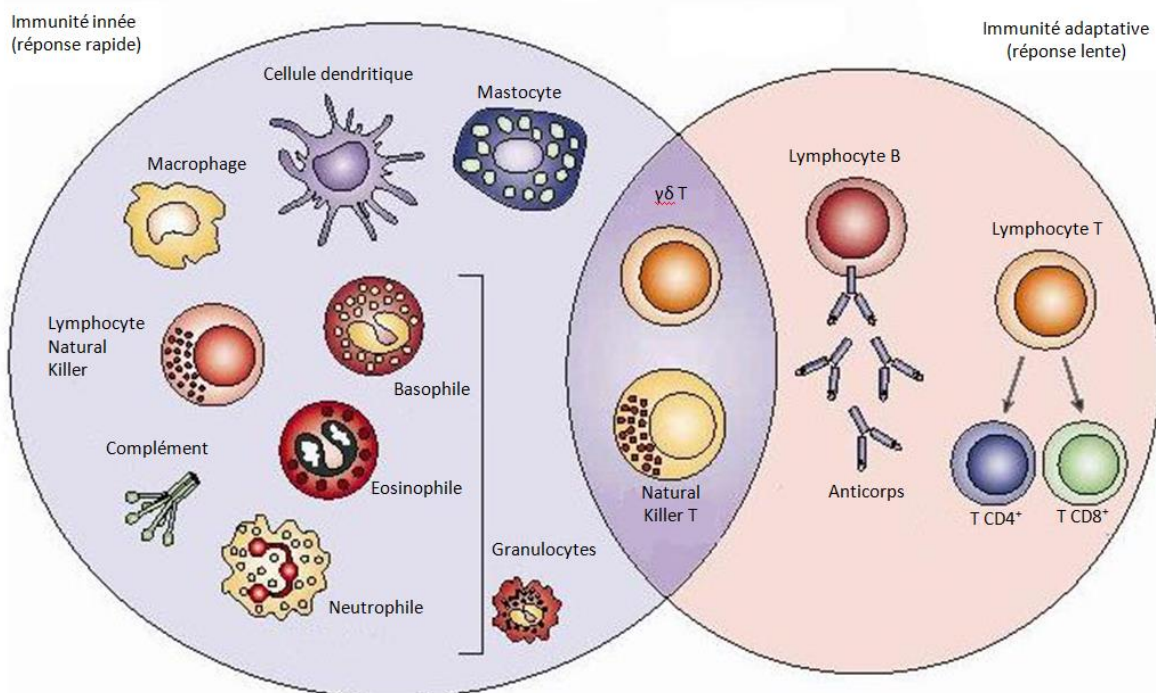


Figure 14: Le système immunitaire de l'Homme repose sur deux piliers, - l'immunité spécifique constituée des lymphocytes T et B, de cinétique lente mais douée de mémoire - et l'immunité innée où participent de nombreuses cellules hématopoïétiques (polynucléaires, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques, lymphocytes NK), de déclenchement rapide sans mémorisation des expériences passées.

Figure 14: Mécanisme d'action du système immunitaire (Bensa, 2005).

2. 2. 1. Immunité naturelle

L'immunité naturelle se déclenche sur le simple contact initial avec l'agent étranger, sans requérir de rencontres antérieures pour déclencher une réponse immunitaire efficace. Elle est constituée de deux lignes de défense : les barrières physiologiques (peau, glandes de la peau, muqueuses, appareil ciliaire, système phagocytaire, système réticulo-endothélial, cellules tueuses naturelles, système complément) et les cytokines (interleukines, interférons).

2. 2. 2. Immunité adaptative

Ce type d'immunité comprend les anticorps et les cellules qui peuvent attaquer et détruire des agents envahisseurs spécifiques. Pour que ce type d'immuno-réponse atteigne son efficacité maximale, une exposition antérieure à l'agent étranger ou à l'organisme envahisseur est requise. L'immuno-réponse est relativement lente mais l'immunité conférée est durable. La capacité de réponse aux stimuli immunologiques se situe principalement dans les cellules lymphoïdes (**Figure 14**). Il y a deux populations principales de lymphocytes qui sont les lymphocytes T (ou cellules T) et les lymphocytes B (ou cellules B). Les cellules B s'attaquent aux micro-organismes extracellulaires et à leurs produits en sécrétant des anticorps qui reconnaissent spécifiquement l'antigène. Les lymphocytes T ont une gamme d'activités plus large. Certains sont impliqués dans le contrôle du développement des lymphocytes B et de la production d'anticorps. D'autres cellules T interagissent avec les cellules phagocytaires pour les aider à détruire les micro-organismes intracellulaires.

En pratique, il y a beaucoup d'interactions entre les lymphocytes et les cellules phagocytaires ; certains phagocytes peuvent absorber des antigènes et les présenter aux cellules T : ce processus est appelé présentation de l'antigène. De leur côté, les lymphocytes T sécrètent des facteurs solubles, les cytokines, qui stimulent les phagocytes et leur permettent de détruire les micro-organismes. Du fait de ces interactions, la plupart des réponses immunitaires vis-à-vis des agents infectieux mettent en jeu à la fois des éléments de l'immunité naturelle et de l'immunité spécifique. Aux stades initiaux de l'infection, l'immunité naturelle prédomine puis, ultérieurement, les lymphocytes mettent en place des réponses spécifiques adaptées à chaque microorganisme.

2. 3. Les cellules immuno-compétentes

2. 3. 1. Les phagocytes mononuclées

Ils correspondent aux monocytes et à toutes les autres cellules qui en découlent. Les monocytes ne demeurent que 2 ou 3 jours dans la circulation sanguine d'où ils peuvent migrer vers les organes et tissus de l'organisme et devenir des macrophages différenciés, grandes

cellules au polymorphisme considérable qui possèdent un grand nombre de récepteurs membranaires. Ces macrophages sont distribués dans tout l'organisme (foie, rate, ganglions lymphatiques, cerveau, poumons, cavités séreuses pleurale et péritonéale, tractus gastro-intestinal, etc.). Les macrophages jouent un rôle tant dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative et ont pour fonctions essentielles la participation à l'inflammation (liaison aux cellules tumorales et transfert de l'information antigénique), une forte activité antitumorale et antibactérienne et la présentation de l'antigène. En l'absence d'activation, les macrophages peuvent proliférer, répondre aux facteurs chimiotactiques et être aptes à la phagocytose.

2. 3. 2. Les phagocytes polynucléaires

Ils sont issus de la lignée granulocytaire. Sur la base de leur aspect cytologique, on distingue les polynucléaires neutrophiles (95% des polynucléaires circulants) qui assurent essentiellement la phagocytose et la bactéricidie, les polynucléaires basophiles impliqués dans les processus d'hypersensibilité IgE-dépendants et les éosinophiles impliqués dans l'élimination des parasites.

2. 3. 3. Les lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules qui, outre leur présence dans le sang, peuplent aussi les tissus lymphoïdes et les organes de même que la lymphe circulant dans les vaisseaux lymphatiques. Les organes lymphoïdes comprennent le thymus, la moelle osseuse, la rate, les nodules lymphoïdes, les amygdales, les plaques de Peyer et les tissus lymphoïdes du système respiratoire et du tube digestif. La plupart des lymphocytes qui circulent dans le sang se trouvent en état de repos. Ils ressemblent à de petites cellules ayant un noyau circulaire compact qui occupe la quasi totalité du volume cellulaire. Par conséquent, le cytoplasme est beaucoup plus réduit. Les lymphocytes des organes et des tissus lymphoïdes peuvent être activés de façon différente par suite d'une stimulation antigénique.

2. 3. 3. 1. Les lymphocytes B

Ils se composent de lymphocytes qui, à l'inverse des cellules T, ne requièrent pas le thymus pour la maturation. Ils représentent 10 à 20% des lymphocytes du sang périphérique. Ils se développent dans les tissus lymphoïdes périphériques (ganglions, rate) et dans la moelle osseuse. Le récepteur des cellules B (BCR, de l'anglais B Cell Receptor) est constitué par une immunoglobuline ou anticorps (Ig) membranaire et permet la reconnaissance des antigènes circulants. Chaque lymphocyte B exprime une seule Ig de surface, le plus souvent IgM, parfois

IgG, IgA ou IgM+IgD. Ils sont la source de l'immunité dite "humorale" grâce à la production des anticorps. Ces derniers attaquent les matières étrangères et les agglutinent pour les faire détruire par les autres composants de l'immuno-système. La reconnaissance d'un antigène par les lymphocytes B induit leur prolifération et leur différenciation en centroblastes, centrocytes, puis en plasmocytes qui vont produire les anticorps spécifiques de l'antigène. L'immunité à médiation d'anticorps est importante dans les troubles induits par des toxines, dans certaines infections microbiennes, ou pour écourter quelques infections virales.

2. 3. 3. 2. Les lymphocytes T

Ce sont les lymphocytes produits dans le thymus (petite glande située dans le thorax) et les organes lymphoïdes périphériques. Le thymus est nécessaire à leur maturation. Au cours de cette maturation, ils expriment différents marqueurs de surface : CD2 et CD3 exprimés sur la totalité des lymphocytes circulants, CD4 exprimés par les lymphocytes T auxiliaires encore appelés TH (lymphocyte T CD4⁺ « helper ») sur 60 à 70% des lymphocytes circulants et CD8⁺ exprimés par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Les CD4⁺ ont la fonction d'activer les autres lymphocytes en sécrétant des cytokines. Les CD8⁺ ont une activité cytolytique et éliminent les cellules étrangères ou les cellules infectées par un virus ou un parasite intracellulaire. Les cellules T sont la source de l'immunité à médiation cellulaire, qui stimule la résistance et aide au rétablissement après la plupart des infections microbiennes. On peut stimuler les lymphocytes T *in vitro* à l'aide de mitogènes (phytohématoglutinine ou PHA, Concanavaline A ou Con-A, Pokeweed Mitogen ou PWK).

Contrairement aux lymphocytes B, les lymphocytes T ne sont capables de reconnaître l'antigène que si celui-ci est présenté à la surface de cellules spécialisées dites présentatrices de l'antigène (CPA) sous forme de petits fragments peptidiques. Les fragments d'antigènes sont représentés en association avec des molécules spécialisées dans cette fonction et codées par un ensemble de gènes, appelées complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les cellules T utilisent leurs récepteurs spécifiques d'antigènes (T Cell Receptor ou TCR) pour reconnaître les peptides antigéniques associés à ces molécules du CMH. Le complexe majeur d'histocompatibilité joue un rôle primordial dans de nombreux aspects du fonctionnement du système immunitaire.

2. 4. Inflammation et immunité : implications dans l'obésité et le diabète

2. 4. 1. Cellules Th1 (pro-inflammatoires) et cellules Th2 (anti-inflammatoires)

2. 4. 1. 1. Le concept Th1-Th2

C'est dans les années 1980 que Tim Mosmann a proposé une classification des lymphocytes auxiliaires à partir de données obtenues chez le rongeur (Mosmann et coll., 1986; Mosmann and Coffman, 1989).

- Les lymphocytes de type 1 (Th1 :**pro-inflammatoires**) synthétisent de l'IL-2 et de l'interféron gamma (IFN- γ) et,
- Les lymphocytes de type 2 (Th2 :**anti-inflammatoires**) synthétisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13.

Alors que l'IFN- γ et l'IL-2, (Th1) contribuent directement aux mécanismes de défense anti-infectieuse, par activation des monocytes et des macrophages, les effets des cytokines Th2 semblent favoriser le système de défense antiparasitaire en produisant l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13. En effet, les Th2 stimulent les éosinophiles et les mastocytes, et augmentent la synthèse d'anticorps, en particulier de classe IgE (Immunoglobulines de type E), ce qui supprime l'immunité à médiation cellulaire (**Figure 15**).

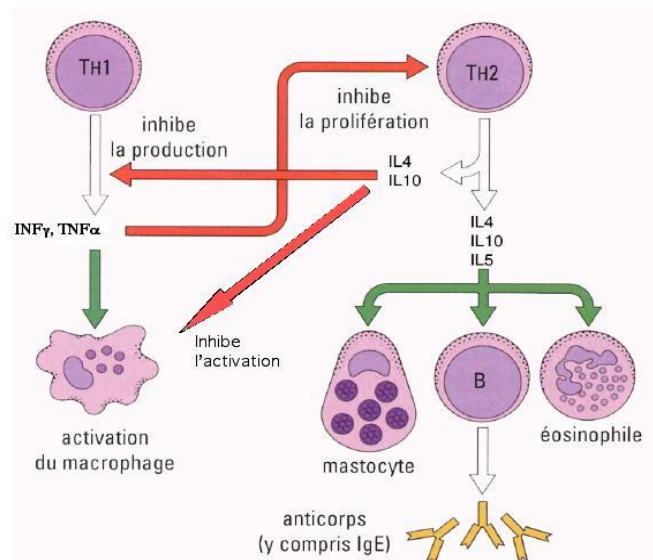


Figure 15: Le concept Th1-Th2 (Bensa, 2005).

Cette dualité fonctionnelle des lymphocytes T auxiliaires a été retrouvée pour d'autres lymphocytes comme les lymphocytes T cytotoxiques ou les cellules NK (Natural killer). La notion de lymphocyte Th1-Th2 a par la suite été étendue à l'homme bien que certaines nuances doivent être apportées au concept. Alors que la séparation de cellules Th1 et Th2 peut être faite

chez la souris en se fondant sur la production de cytokines, ce clivage est plus difficile chez l'homme, les lymphocytes pouvant synthétiser des cytokines de manière plus ubiquitaire, probablement en fonction du type de stimulus. La production d'IFN- γ est, par exemple, souvent le fait de cellules synthétisant par ailleurs des cytokines Th2 comme l'IL-4 (Cohen, 2000). Il est ainsi plus réaliste de définir un profil de cytokine et d'analyser le rapport de cytokines Th1/Th2 pour différencier ces deux sous-types lymphocytaires. Leur dualité fonctionnelle reste cependant un concept intéressant qui a été largement utilisé pour expliquer la physiopathologie de certaines maladies comme les maladies allergiques attribuées à une réponse Th2 exacerbée mais aussi les affections auto-immunes associées à une stimulation anormale de la réponse Th1. Par ailleurs le profil Th1–Th2 des lymphocytes a été étudié dans l'acquisition de la réponse immunitaire au cours des premiers mois de la vie. Il semble ainsi que la fonction lymphocytaire auxiliaire *in utero* soit dominée par une réponse de type Th2, probablement pour détourner les mécanismes de défense d'une réaction auto-immune, la grossesse étant immunologiquement superposable à une hémi-allogreffe. Pendant les premiers mois de vie, les stimulations antigéniques, en particulier de nature virale ou bactérienne, contribueraient au développement de la réponse Th1 (Cohen, 2000; Holt, 1996). Une telle approche laisse supposer l'importance de l'environnement dans le développement des maladies liées à une anomalie de la balance Th1–Th2.

La stimulation plus ou moins prolongée des cellules Th0 (cellules T à l'état de repos) par un antigène spécifique permet leur différenciation vers deux phénotypes, Th1 ou Th2, qui sont caractérisés par des profils de synthèse de cytokines différents (**Figure 16**). Les cellules Th1 produisent l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron- γ (IFN- γ) ; elles activent les monocytes et les macrophages et sont donc considérées comme pro-inflammatoires. Par contre, les cellules Th2 produisant l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13, sont considérées comme anti-inflammatoires ; elles stimulent les éosinophiles et les mastocytes, et augmentent la synthèse d'anticorps, en particulier de classe IgE (immunoglobulines de type E), ce qui supprime l'immunité à médiation cellulaire. Le profil initial des cytokines, dont la synthèse est déclenchée par le pathogène, et la concentration locale de différents stéroïdes déterminent l'orientation des cellules Th0 vers les deux sous-populations. Par exemple, si un micro-organisme déclenche la sécrétion d'IL-12 par les macrophages et d'IFN- γ par les cellules NK (Natural Killer), la différenciation sera orientée vers le phénotype Th1, tandis que la libération d'IL-4 favorise une réponse de type Th2. Une fois établi, chaque phénotype tend à supprimer le phénotype opposé. En effet, l'IFN- γ des cellules Th1 inhibe la prolifération des cellules Th2,

alors que l'IL-10 des cellules Th2 bloque la production de cytokines par les cellules Th1 (Figure 16).

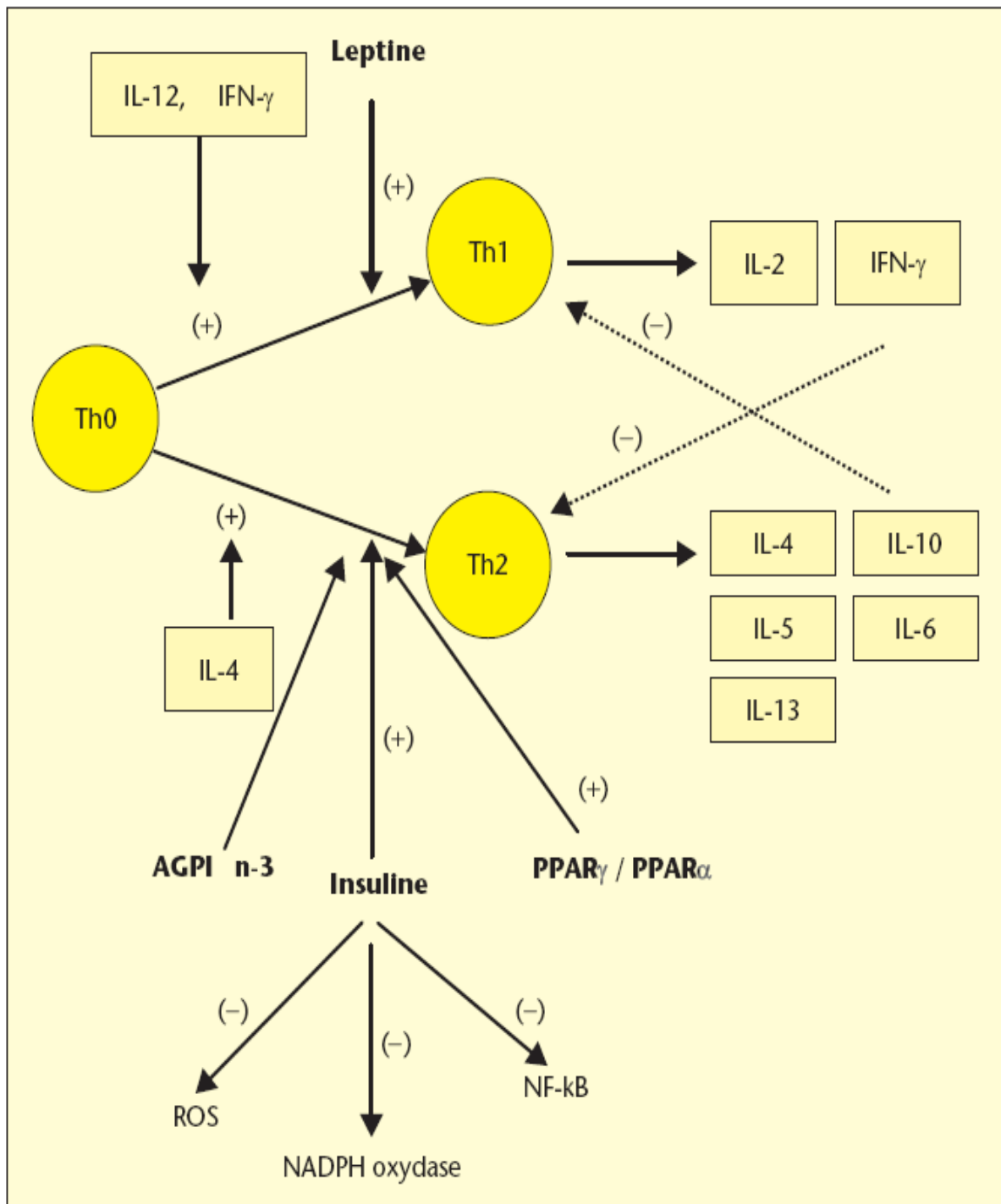


Figure 1 : Différenciation des lymphocytes Th0 en cellules Th1 et Th2 et, leurs modulations. Ces cellules sont identifiées par la sécrétion de leurs cytokines respectives. Les cellules Th0, sécrétant l'IL-2, se différencient en Th1, sous l'action de l'IL-12 et l'IFN-c, libérés, respectivement, par les macrophages et les cellules NK (Natural killer). Par ailleurs, le phénotype Th2 est induit par l'action de l'IL-4, produite par les mastocytes. L'IFN-c et l'IL-10, à leur tour, exercent un effet inhibiteur, respectivement sur la différenciation de phénotypes Th2 et Th1. L'insuline, les agonistes de PPAR et les AGPI n-3 favorisent la différenciation en phénotype Th2. L'insuline diminue aussi la production de ROS et l'activité du NADPH oxydase et du NF-kB. Cependant, la leptine favorise la différenciation en cellules Th1. (+), effet inducteur ; (-), effet inhibiteur.

Figure 16: Différenciation des lymphocytes Th0 en cellules Th1 et Th2 et leurs modulations (Khan, 2006).

2. 4. 2. Cellules Th1 et Th2 dans l'obésité et l'insulino-résistance

Nous ne décrivons pas ici le rôle des cellules Th1 dans la pathogenèse du diabète de type 1 car il est bien connu que ces cellules, après infiltration du pancréas, détruisent les cellules bêta et aggravent cette pathologie (Muller et coll., 2002; Wood, Rao, and Frey, 1999).

Il a été récemment développé un modèle de bébés macrosomiques, nés de rattes rendues diabétiques qui, à l'âge adulte, deviennent obèses, qui sont marqués par l'augmentation du taux de lipides (cholestérol total, LDL, VLDL, etc.) et qui développent l'insulino-résistance. De même, il a été constaté que ces animaux obèses ont un taux très élevé en cytokines pro-inflammatoires, l'IFN- γ et l'IL-2 (Khan et coll., 2006). Chez ces mêmes animaux, il n'y a pas eu modification du taux de l'IL-4, mais le rapport IFN- γ /IL-4 augmente de l'ordre de 21, suggérant que la différenciation des cellules naïves Th0 vers le phénotype Th1 est accélérée lors de l'installation de l'obésité (Khan et coll., 2006). A notre surprise, nous avons constaté que le taux de cytokines pro-inflammatoires Th1 diminue chez les sujets atteints du diabète gestationnel (Ategbro et coll., 2006). En effet, il a été démontré qu'une baisse du phénotype Th1 est impliquée dans l'installation de la grossesse. Les bébés macrosomiques, nés de ces mères, ont par contre une différenciation accélérée vers le phénotype Th1, indiquant un état inflammatoire de ces enfants.

(Verwaerde et coll., 2006) ont effectué une étude sur des souris maintenues sous un régime riche en lipides (HFD en anglais, *high fat diet*). Ils ont démontré que ce régime module les fonctions lymphocytaires car ils constatent l'augmentation du rapport IFN- γ /IL-4, indiquant un rôle du système immunitaire dans le micro-environnement hépatique de la souris ob/ob (souris obèses déficientes en leptine). Ils ont constaté que le régime HFD induit l'obésité chez ces animaux et oriente la différenciation des cellules T hépatiques vers le phénotype Th1. ***Ainsi les cellules Th1, responsables de l'inflammation hépatique, pouvaient aggraver l'obésité et l'insulino-résistance.***

2. 4. 3. Modulation des cellules Th1/Th2 par la leptine, l'adiponectine et l'insuline

La leptine, impliquée dans la régulation de l'obésité, en modifiant le métabolisme lipidique, diminue l'appétit en interférant avec le neuropeptide Y et le récepteur de la mélanocortine dans l'hypothalamus (Halaas et coll., 1995; Li, Soloski, and Diehl, 2005). La leptine est également produite par le placenta ; sa concentration est élevée chez les sujets obèses. Elle exerce un effet agrégeant sur les plaquettes sanguines et, par conséquent, pourrait réguler le système immunitaire. Les récepteurs de la leptine ont été récemment identifiés sur les lymphocytes murins (Papathanassoglou et coll., 2006) ; ils inhibent l'apoptose cellulaire T et

favorisent leur survie en modifiant la signalisation *via* le facteur de transcription STAT-3 qui régule les gènes de réparation de l'ADN et permet la résistance aux traitements génotoxiques (Vigneron et coll., 2006). En ce qui concerne la différenciation cellulaire T, la leptine induit la polarisation des cellules Th0 vers le phénotype Th1 et augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

Une étude effectuée sur des enfants obèses indique une corrélation positive entre le pourcentage de cellules T sécrétant l'IFN- γ , la concentration de leptine et l'insulino-résistance (Pacifico et coll., 2006). Lorsque les cellules dendritiques humaines sont traitées par cette protéine, on constate qu'elles favorisent la polarisation des cellules naïves Th0 vers le phénotype Th1 et diminuent la sécrétion de l'IL-10, une cytokine de phénotype Th2 (Mattioli et coll., 2005). Chez les enfants malnutris, l'augmentation du poids corporel est liée à l'augmentation du taux de leptine et à la différenciation accélérée des cellules Th1 qui sécrètent abondamment l'IFN- γ (Palacio et coll., 2002). *Il est maintenant clairement établi que la leptine, en stimulant la différenciation des cellules Th0 vers le phénotype Th1, exerce une action pro-inflammatoire.*

En ce qui concerne l'**adiponectine**, nous ne disposons pas d'étude directe qui démontre son action sur la différenciation de ces cellules. Il a été démontré que l'inflammation hépatique, induite par l'activation des cellules T, est associée à une baisse du taux d'adiponectine (Morris et coll., 2006), suggérant *un effet anti-inflammatoire de cette adipokine.*

Les lymphocytes T n'expriment les récepteurs de l'insuline (IR) que s'ils sont activés. Dès lors, l'insuline oriente la différenciation des lymphocytes naïfs vers le phénotype Th2 (Viardot et coll., 2007), indiquant que les *effets anti-inflammatoires de cette hormone passeraient également par une action directe sur ces cellules immunitaires.* Ces observations, à nouveau, démontrent une interaction entre la différenciation des cellules T et cette hormone hypoglycémisante.

2. 4. 4. Rôle des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) dans l'obésité et l'insulino-résistance

Il a été démontré que le tissu adipeux, mis à part la sécrétion des adipokines (adiponectine et leptine), sécrète également des cytokines pro-inflammatoires, principalement TNF- α et IL-6. (Creely et coll., 2007) ont étudié l'interaction entre les adipokines et les récepteurs TLR (*toll-like receptors*), impliqués dans la détection des composés microbiens, sur des adipocytes humains isolés. Ils en ont conclu que le lipopolysaccharide, composant essentiel

de la paroi bactérienne, augmente non seulement la sécrétion de l'IL-6, du TNF- α mais également l'expression de TLR-2 sur les adipocytes *via* la cascade de l'inflammation.

En ce qui concerne TNF- α , on peut noter les observations suivantes: 1) TNF- α est exprimé d'une manière constitutive par le tissu adipeux; 2) les souris génétiquement obèses (ob/ob) et les rats (fa/fa Zucker) expriment abondamment cette cytokine dans leur tissu adipeux (Hotamisligil et coll., 1995; Hotamisligil et coll., 1994b), et 3) TNF- α est le médiateur de l'insulino-résistance chez ces animaux. Le tissu adipeux des sujets obèses contient donc beaucoup plus de TNF- α que celui des sujets minces (Hotamisligil et coll., 1994a; Sartipy and Loskutoff, 2003).

Il a été signalé par (Weisberg et coll., 2003) que le tissu adipeux des sujets obèses contient non seulement des adipocytes mais aussi des cellules endothéliales et des macrophages qui l'infiltrent. Ces mêmes auteurs ont démontré que l'IMC est directement lié au degré d'infiltration des macrophages. De plus, les adipocytes libèrent des facteurs qui favorisent l'infiltration et la différenciation des macrophages comme le MCP-1 « *monocyte chemotactic protein-1* », un agent chimiotactique monocytaire, et le CSF-1 « *colony stimulating factor* », un facteur responsable de la différenciation monocyte-macrophage. Récemment (Lacasa et coll., 2007), effectuant des expériences sur des adipocytes humains en présence de surnageant de macrophages, ont suggéré que les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux pourraient exercer une action paracrine et, par conséquent, moduler les fonctions adipocytaires.

Il existe une corrélation positive entre TNF- α et le taux de C-peptide (Winkler et coll., 2002). Le tissu adipeux de sujets obèses contient beaucoup plus d'iNOS « *inducible NO synthase* », de TGF- β 1 « *Transforming Growth Factor-beta-1* », de protéine C-réactive et d'ICAM « *Intercellular Adhesion Molecule* » que les sujets minces (Hotamisligil et coll., 1994a; Sartipy and Loskutoff, 2003). Il est intéressant de noter que le taux des ARNm de TNF- α diminue après une baisse de poids chez les sujets obèses (Hotamisligil et coll., 1995; Kern et coll., 1995). (Clement et coll., 2004) ont constaté, chez les patients obèses, qu'un régime peu calorique diminue non seulement la masse graisseuse mais également l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires dans les adipocytes. Ce régime augmente par contre l'expression des gènes codant pour les agents anti-inflammatoires. D'autres études démontrent aussi qu'une baisse de l'IMC est associée à la diminution de facteurs inflammatoires chez les sujets obèses (Esposito et coll., 2003; Kopp et coll., 2003). ***Ces observations suggèrent qu'il existe une corrélation directe entre l'obésité et l'état inflammatoire*** (Dandona, Aljada, and Bandyopadhyay, 2004; Dandona et coll., 2005; Dandona et coll., 1998).

Il a été démontré que TNF- α interfère avec le mécanisme d'action de l'insuline, probablement, au niveau de l'activation des récepteurs tyrosine kinases de cette hormone (Cheatham and Kahn, 1995). L'effet inhibiteur de TNF- α sur l'insuline va également influencer la lipogenèse adipocytaire et stimuler la lipolyse (Eckel, 1992), suggérant que TNF- α est un modulateur des fonctions adipocytaires. L'administration des récepteurs de TNF- α , qui se fixent sur la cytokine TNF- α endogène, normalise l'insulino-sensibilité (Hotamisligil, Shargill, and Spiegelman, 1993).

Une croissance soutenue du tissu adipeux aboutit au développement du syndrome métabolique marqué par le diabète de type 2, de l'hypertension et de l'état inflammatoire. L'inhibiteur physiologique de l'activateur tissulaire du plasminogène (PAI-1) constitue l'un des facteurs impliqués dans ce processus. En effet, il a été rapporté que TNF- α , sécrété par les adipocytes, serait responsable de l'augmentation de la concentration plasmatique de PAI-1, puis de complications cardio-vasculaires (Samad et coll., 1999). ***On peut donc conclure que TNF- α est responsable de l'insulino-résistance*** (Dandona, Aljada, and Bandyopadhyay, 2004; Dandona et coll., 2005) ***et que son rôle principal serait d'induire l'inflammation et de prolonger un état d'insulino-résistance.***

L'IL-6 semble également être impliquée dans la pathogenèse du diabète de type 2, l'adiposité anormale et les anomalies lipidiques (Mohamed-Ali et coll., 1997). ***Il est intéressant de noter qu'entre 10 et 30% du taux d'IL-6 circulant sont dérivés des tissus adipeux, ce qui suggère son rôle probable dans les pathologies métaboliques.*** L'IL-6 régule l'équilibre énergétique. Chez l'homme et chez l'animal, il existe une corrélation positive entre son taux et celui de la leptine. L'IL-6 peut aussi jouer un rôle dans l'adiposité au niveau central. En effet, l'hypothalamus ventro-médiane, région qui contrôle l'équilibre énergétique, exprime les récepteurs de l'IL-6 (Schobitz et coll., 1993). Les souris, n'exprimant pas le gène de cette cytokine, développent prématurément l'obésité car elles mangent exagérément (Wallenius et coll., 2002) alors que son administration intra-cérébro-ventriculaire corrige l'obésité (Wallenius et coll., 2002) et diminue la masse grasseuse chez les primates (Ettinger et coll., 1995). Malgré ces observations, le rôle exact de l'IL-6 dans la régulation de l'obésité n'est pas bien défini. Toutefois, ***il existe une corrélation positive entre le taux de l'IL-6 circulant, l'adiposité*** (Mohamed-Ali et coll., 1997) ***et l'insulino-résistance*** (Bastard et coll., 2002).

Il a été suggéré que l'augmentation de TNF- α et de l'IL-6 chez les sujets diabétiques est une conséquence du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie (Sternberg et coll., 1992). (Mohanty et coll., 2000) ont démontré que l'ingestion de glucose chez les sujets normaux

diminue la concentration de l' α -tocopherol (vitamine E) et augmente l'expression du facteur cytosolique p47phox dans les cellules mononucléaires périphériques. De plus, chez ces sujets, la production des ROS (en anglais, *reactive oxygen species*) augmente de l'ordre de 200% par rapport à la concentration basale. ***Tout comme TNF- α , l'IL-6 diminue également la signalisation de l'insuline*** (Senn et coll., 2002) ***et, par conséquent, contribue à l'insulino-résistance.***

2. 4. 5. Interactions entre adiponectine, leptine, IL-6 et TNF- α

L'adiponectine exerce un effet insulino-sensibilisant, anti-athérogénique et anti-inflammatoire; son taux élevé est parallèle à l'insulino-sensibilité (Diez and Iglesias, 2003). L'adiponectine agit comme une hormone insulino-sensibilisante dans le foie et les muscles et, par conséquent, augmente l'oxydation des acides gras dans les muscles squelettiques (Combs et coll., 2001; Hotta et coll., 2001). (Bahia et coll., 2006) ont effectué une étude sur des sujets minces et obèses, atteints du syndrome métabolique et ont établi une corrélation entre le faible taux d'adiponectine et ceux élevés de la CRP, du fibrinogène et de PAI-I observés chez les sujets obèses. (Meller et coll., 2006) ont démontré que la concentration de l'adiponectine diminue au cours des grossesses compliquées par le diabète maternel, diminution responsable, en partie, de l'hyperglycémie.

Nous avons récemment démontré que les femmes atteintes de diabète gestationnel ont un taux d'adiponectine significativement bas comparées aux sujets témoins (Ategbo et coll., 2006). Il existerait une corrélation inverse entre le taux plasmatique d'adiponectine, l'insulino-résistance, le taux de triglycérides et des récepteurs de TNF- α (Fernandez-Real et coll., 2000). L'adiponectine augmente l'insulino-sensibilité mais son mécanisme d'action n'est pas encore élucidé (Arita et coll., 1999), bien que ses deux récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 soient exprimés dans les îlots pancréatiques (Staiger et coll., 2005). ***La cytokine TNF- α et l'adiponectine peuvent contrecarrer leurs mécanismes d'action ; ils exercent des effets opposés sur la signalisation de l'insuline*** : TNF- α diminuant et l'adiponectine augmentant la phosphorylation des récepteurs tyrosine kinases de l'insuline (Stefan et coll., 2002). De plus, les taux élevés de TNF- α peuvent aboutir à une baisse de la synthèse de l'adiponectine, car le premier freine la synthèse du dernier (Ruan and Lodish, 2004). Par ailleurs, (Lihn et coll., 2003) constatent que ***TNF- α et IL-6 diminuent la synthèse et l'expression de l'ARNm de l'adiponectine.***

La leptine induit la sécrétion de TNF- α et de IL-6 ainsi que celle de l'IL-1 β (Mattioli et coll., 2005) ; elle semble exercer un effet immuno-modulateur qui augmente le risque de l'infection. Il est intéressant de noter que les souris *ob/ob* qui ne synthétisent pas cette adipokine sont susceptibles aux infections car leur système immunitaire est déprimé. Ces souris sont résistantes pour des pathologies auto-immunes qui nécessitent l'activation prolongée du système immunitaire. L'administration de la leptine exogène à ces animaux restaure l'installation de ces pathologies et accélère l'installation du diabète chez la souris NOD (en anglais, *Non Obese Diabetic*) (Matarese et coll., 2002). Toutes ces observations sont en accord avec le fait que *la leptine est l'inductrice de la différenciation cellulaire Th0 en phénotype Th1 qui sécrète les cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'installation des pathologies auto-immunes*. Il est à noter que les femmes ont un taux plus élevé de leptine que les hommes et qu'elles développent les maladies auto-immunes beaucoup plus fréquemment que ces derniers. La leptine induit également le stress oxydatif, l'inflammation dans les cellules endothéliales (Matarese et coll., 2002) et l'activation du facteur transcriptionnel NF-kB (*Nuclear Factor-kappa B*) (Mattioli et coll., 2005). Au cours du diabète gestationnel, le rôle de la leptine n'est pas très clair mais nous avons récemment démontré que le taux de cette adipokine et celui des cytokines pro-inflammatoires avaient augmenté chez nos patientes (Ategbo et coll., 2006). Lorsqu'on provoque une inflammation hépatique en injectant à des souris la concavaline-A, on constate une augmentation de la sécrétion de leptine et de TNF- α alors que la concentration de l'adiponectine diminue (Morris et coll., 2006). De plus, l'administration des anticorps anti-TNF- α diminue l'inflammation et restaure le taux de l'adiponectine. *Ces résultats suggèrent que la leptine est pro-inflammatoire et que l'adiponectine exerce un effet anti-inflammatoire.*

2. 5. Inflammation placentaire et insulino-résistance

Le fœtus est isolé de la mère par le placenta, qui régule, en grande partie, l'ambiance hormonale dans laquelle baigne le fœtus (Handwerger and Freemark, 2000). Un de ses rôles les plus fondamentaux est de permettre l'échange des substances contenues dans le sang de la mère et du fœtus, apportées par différents canaux ou transporteurs, sans jamais les mettre en contact direct, et ainsi apporter à l'embryon les nutriments et l'oxygène tout en évacuant les déchets (dioxyde de carbone, urée...).

Le placenta produit aussi un grand nombre d'hormones telles que l'hormone de croissance, la prolactine, l'hormone chorionique gravidique, la leptine ainsi que des facteurs de croissance, tels que l'IGF, FGF et PDGF (Fulton, Richardson, and Sharma, 2006). C'est ainsi

que le placenta régule la croissance du fœtus. (Heinig et coll., 2000) ont démontré que les placentas de femmes diabétiques expriment abondamment les ARNm codant pour le PDGF. De plus, l'insuline augmente la phosphorylation du récepteur au PDGF dans le placenta de femmes diabétiques et, par conséquent, accroît la taille du fœtus (Zhuang et coll., 2008).

Le placenta est la cible de l'hyper-insulinémie maternelle et de l'IGF-1 qui augmentent le transport des acides aminés et du glucose au travers de cet organe vers le fœtus (Kniss et coll., 1994). En effet, lors du diabète, le nombre de récepteurs placentaires de l'insuline et de l'IGF-1 augmente de façon très significative chez ces femmes (Bhaumick, Danilkewich, and Bala, 1988).

En ce qui concerne le statut pro-inflammatoire du placenta, nous disposons de peu d'études sur ce sujet. Cependant, de rares études ont montré les modifications hormonales sur le versant foeto-placentaire (Radaelli et coll., 2003) et ces études sont en accord avec les résultats précédant pour IL-1, IL-6, TNF- α et leptine (Ategbo et coll., 2006; Khan, 2006). Enquobahrie et coll., (2009) ont démontré la modification de 65 gènes dans le placenta de femmes atteintes de DG. L'expression des gènes codant pour les protéines de stress est également altérée dans le placenta des femmes diabétiques (Radaelli et coll., 2003). Le placenta de femmes normales exprime 4 isoformes de récepteur de la leptine (Li et coll., 2004) mais leur expression anormale n'est pas encore mise en évidence au cours du DG. Ainsi, l'ensemble des résultats précédents incite à penser que l'environnement inflammatoire associé au DG pourrait participer à l'hyper-insulinémie fœtal, facteur de risque majeur du diabète post-natal.

Du fait que le DG soit lié à l'augmentation du statut inflammatoire de mères diabétiques et de bébés macrosomiques, il est possible que l'expression des ARNm, codant pour les facteurs pro-inflammatoires dans le placenta, soit augmentée. Ces signaux inflammatoires favoriseront l'excès pondéral et l'adiposité chez les fœtus, et pourront augmenter le risque de développer ultérieurement une obésité car il est récemment établi que l'installation de l'obésité est liée aussi à l'augmentation du statut pro-inflammatoire des sujets (Dandona, Aljada, and Bandyopadhyay, 2004; Dandona et coll., 2005). Par la production de facteurs inflammatoires, le placenta pourrait être aussi à l'origine d'une partie des troubles métaboliques maternels, en particulier l'insulino-résistance, chez la femme obèse.

En faite, les patientes atteintes de DG sont fréquemment en surpoids. Ce dernier, comme l'insulino-résistance (Bastard et coll., 2000), est corrélé à l'augmentation du taux d'IL-6 sanguin (Bastard et coll., 2000; Esposito et coll., 2003). Non seulement les cellules T mais les adipocytes également sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, le TNF- α et principalement

l'IL-6 qui semble être impliqué dans la pathogenèse du diabète de type 2, adiposité anormale ou bien dans les anomalies lipidiques. Il est intéressant de noter qu'entre 10 et 30 % de l'IL-6 circulant sont dérivé des tissus adipeux, ce qui suggère son rôle probable dans les pathologies métaboliques. L'IL-6 régule aussi l'équilibre énergétique. Il existe une corrélation positive entre le taux de l'IL-6 et de la leptine chez l'homme et l'animal. Par ailleurs, plus qu'une simple corrélation, il a été démontré que l'IL-6 a un rôle hyperglycémiant de mécanisme encore inconnu dans le plasma maternel (Tsigos et coll., 1997). Son augmentation dans le placenta pourrait donc, au même titre que dans le plasma des patientes atteintes de DG, jouer un rôle dans la genèse de cette pathologie.

De plus, l'IL-6 est également produit par les macrophages qui secrètent aussi TGF- β dans le milieu extracellulaire lors de l'inflammation. Nous avons constaté une expression élevée des marqueurs de macrophages et du TGF- β dans les placentas des femmes DG. Ces observations suggèrent l'augmentation de l'état pro-inflammatoire dans ces placentas lors du diabète gestationnel.

L'adiponectine est connue pour être une adipocytokine anti-inflammatoire par inhibition macrophagique (Pittas, Joseph, and Greenberg, 2004). Cependant, on note, dans le placenta des femmes atteintes de DG, une augmentation à la fois de l'expression de l'adiponectine, et de l'expression des marqueurs macrophagiques. Ceci suggère, donc, qu'il existe une voie très stimulatrice de l'infiltration macrophagique dans ces placentas, prédominant sur l'adiponectine. Il est à souligner que les ARNm, codant pour la synthèse de la leptine augmentent aussi dans les placentas de femme atteintes de DG. La leptine exerce une action pro-inflammatoire. Une augmentation concomitante de la leptine et de l'adiponectine démontre qu'il existe un équilibre entre le statu pro- et anti-inflammatoire en ce qui concerne les adipokines.

Les TLR contrôlent des aspects multiples de la réponse immunitaire, à la fois innée et adaptative. Le TLR4 joue un rôle en tant que récepteur du *lipopolysaccharide* bactérien et module l'immunité innée dans le placenta. Le TLR4 induit les réponses pro-inflammatoires. Lin et coll., (2006) ont démontré que l'expression élevée de TLR4 dans le placenta induit l'inflammation et augmente le risque de naissance prématurée de bébés. Nos résultats sur l'expression accrue de TLR4 dans les placentas de femmes atteintes de DG suggèrent également un état inflammatoire des placentas de femmes atteintes de DG.

*Diabète gestationnel,
macrosomie et statut antioxydant*

Chapitre III

CHAPITRE 3

Diabète gestationnel, macrosomie et statut antioxydant

3. 1. Le stress oxydant et ses origines

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène, élément indispensable à la vie, produit de manière continue au niveau de la mitochondrie de faibles quantités de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Dans certaines situations, cette production, dont font partie les radicaux libres, augmente fortement, entraînant ainsi un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ses molécules.

3. 1. 1. les radicaux libres

Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire. Le déséquilibre induit par la respiration cellulaire, n'est que transitoire puisque cette propriété les rend hyperactifs et capables d'extraire un électron des molécules voisines pour combler la vacance de leur orbitale. Leur durée de vie est donc très limitée, de l'ordre de la micro-seconde.

3. 1. 2. Production des radicaux libres et naissance du stress oxydant

3. 1. 2.1. Production des radicaux libres

Les radicaux libres sont volontairement produits en permanence par l'organisme lors du métabolisme normal de la cellule. En effet, les systèmes utilisant le transfert d'électrons, normalement contrôlé, sont parfois le lieu de fuites électroniques. Par conséquent, la chaîne respiratoire au niveau des mitochondries, produit le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).

Les cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) possèdent une enzyme, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication du ($O_2^{\cdot-}$) à l'origine de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite (ClO^-), indispensables à la destruction du matériel phagocyté. La xanthine oxydase génère du ($O_2^{\cdot-}$) en présence d'oxygène et de xanthine ou d'hypoxanthine.

Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaire *in vitro* : ils transforment (H_2O_2) en radical hydroxyle (OH^{\cdot}), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique.

Beaucoup de cellules sont capables de produire le radical monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) à partir d'arginine et d'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthétase. Cette production est physiologique et joue par exemple un rôle majeur dans le tonus vasculaire. À forte concentration, le (NO^{\cdot}) devient délétère pour la cellule, notamment en réagissant avec

($O_2^{\cdot-}$) pour former un puissant oxydant, le peroxy-nitrite ($ONOO^{\cdot-}$). En outre, le peroxy-nitrite peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le (NO^{\cdot}) et le (OH^{\cdot}).

L'anion radicalaire superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) ne sont pas très réactifs mais constituent des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives (**Figure 17**). Les radicaux peroxy (ROO^{\cdot}) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$) ne sont pas des radicaux mais sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs des radicaux. L'ensemble de radicaux libres et de leurs précurseurs sont souvent appelés espèces réactives de l'oxygène.

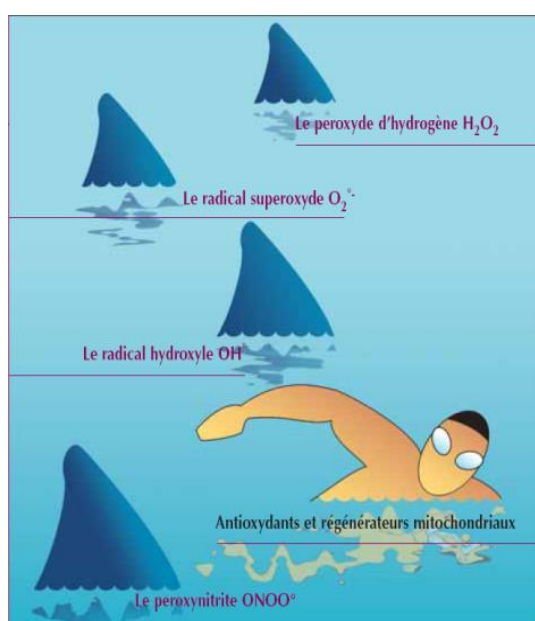


Figure 17: Classification schématique de la nocivité des radicaux libres sur l'organisme humain (Lacroix, 2008).

3. 1. 2.2. Origine du stress oxydant

Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la **respiration mitochondriale (Figure 18)** dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaires. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Si usuellement cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2 %), elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie), ou lorsqu'interviennent des désordres inflammatoires ou nutritionnels.

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les **cellules phagocytaires activées** qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire.

Figure 18: Il existe 5 ensembles de protéines et de coenzymes impliqués dans les oxydations phosphorylantes de la chaîne respiratoire. Les 4 premiers complexes (I, II, III et IV) interviennent dans le transport des électrons et le cinquième (V) intervient dans la synthèse d'ATP. Ces complexes diffusent de façon indépendante au sein de la membrane interne et sont connectés par un transporteur liposoluble mobile, le coenzyme Q, (CoQ) et le cytochrome C fixé à la membrane.

- Complexe I : NADH-ubiquinone réductase ;
- Complexe II : succinate-ubiquinone réductase ;
- Complexe III : ubiquinone-cytochrome C réductase ;
- Complexe IV : cytochrome oxydase ;
- Complexe V : ATP synthétase.

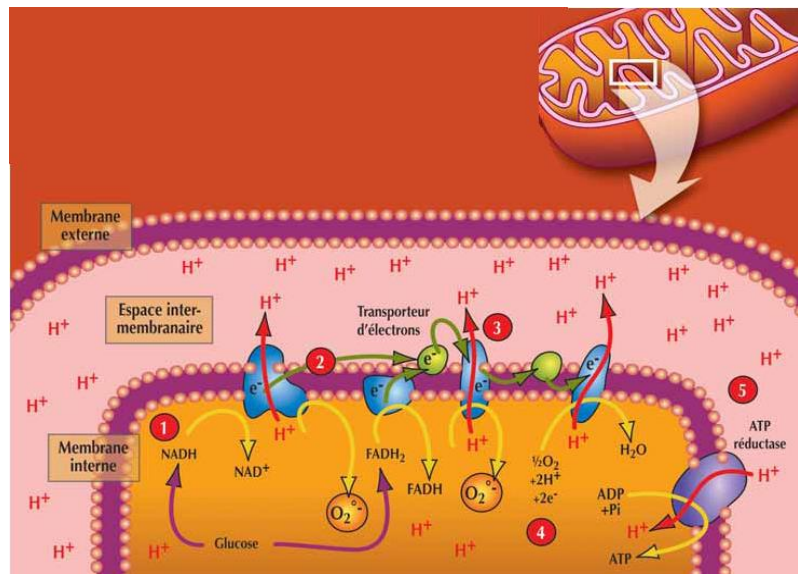


Figure 18: La transformation de l'énergie dans la mitochondrie et production des radicaux libres (Lacroix, 2008).

Dans certaines situations, la production de radicaux libres augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. En raison de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les DRO ont été impliqués dans un très grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Gutteridge and Halliwell, 1993). Pour se protéger contre cet effet toxique de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de réguler la production de ces DRO. Ces systèmes sont composés d'antioxydants (e.g : le groupe des vitamines A, C et E), d'oligo-éléments et de protéines qui empêcheront le fer de déclencher une production de DRO. Des enzymes protéolytiques dont le rôle consiste à dégrader les substrats oxydés, complètent cette panoplie.

Outre la chaîne respiratoire, ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable ; mais la production peut

devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « *stress oxydant* ».

Cette rupture d'équilibre, lourde de conséquence, peut avoir de multiples origines. L'organisme peut avoir à faire face à une production beaucoup trop forte pour être maîtrisée. La rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantité limitée dans l'alimentation. Enfin, la mauvaise adaptation peut résulter d'anomalies génétiques responsables d'un mauvais codage d'une protéine soit enzymatiquement antioxydante, soit synthétisant un antioxydant (comme la gamma glutamyl synthétase produisant le glutathion), soit régénérant un antioxydant, soit couplant la défense à l'énergie (comme la G6PD : *glucose-6-phosphate déshydrogénase*), soit d'un promoteur de ces mêmes gènes que la mutation rendra incapable de réagir à un excès de radicaux. Généralement, le stress oxydant sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène (Figure 19)**.

Déterminer le statut antioxydant d'un individu devient actuellement un sujet de priorité en terme de prévention de maladies car de très nombreuses études indiquent *qu'il existe une association étroite entre l'altération des systèmes de défense antioxydants et le développement de plus de 200 pathophysiologies différentes allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le SIDA, les maladies inflammatoires, le diabète et le vieillissement* (Gutteridge and Halliwell, 1993).

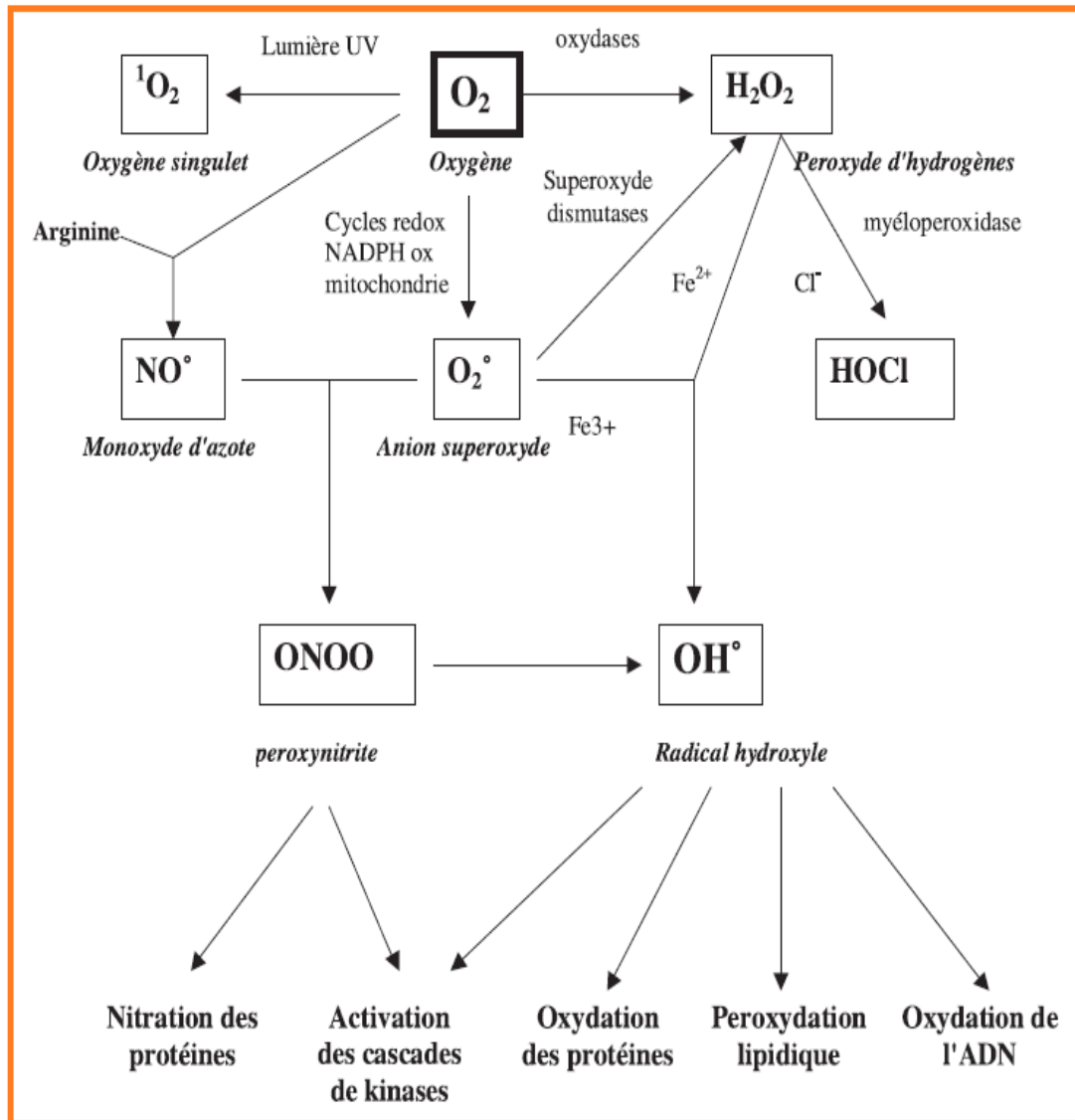


Figure 19 : on distingue un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Ces derniers dérivent de l'oxygène par des réductions d'un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

Figure 19 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

3. 1. 3. Fonction biologique des radicaux libres

Le rôle physiologique de cette production basale de radicaux libres n'est pas totalement connu, mais certaines de ces molécules, lorsqu'elles sont présentées en faibles quantités, pourraient avoir une fonction dans les processus de signalisation cellulaire et jouer le rôle de messagers secondaires (Lander, 1997). Elles agissent, soit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, soit en oxydant et en modifiant d'autres messagers secondaires déjà existants tels que les protéines kinases, protéines phosphatases, facteurs de transcription ou inhibiteurs de facteurs de transcription (Dempfle and Amabile-Cuevas, 1991; Wasserman and Fahl, 1997). De

très nombreuses fonctions des radicaux libres qui, à part la transduction de signaux cellulaires, ont été découvertes récemment ; ils participent au fonctionnement de certaines enzymes (Haddad, 2002), à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certaines neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule (Droge, 2002) et à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Dalton, Shertzer, and Puga, 1999).

3. 1. 4. Surproduction des radicaux libres

Dans certaines situations, tels que l'exposition aux radiations ultraviolettes, les fumées de combustion et de tabac, divers produits chimiques (antiseptiques, médicaments, pesticides, solvants) et les bactéries, la production des radicaux libres augmente fortement et sera responsable de lésions directes de molécules biologiques.

3. 1. 4.1. Conséquences biochimiques

Les cibles principales de ces lésions sont les protéines, les lipides, les glucides et l'ADN. Mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des produits libérés, notamment lors de l'oxydation des lipides peuvent se produire. Cette propriété les implique dans la survenue de nombreuses pathologies humaines telles que les maladies dégénératives, les cancers, les maladies cardio-vasculaires, la cataracte, les inflammations chroniques et les lésions dues à la fumée de tabac. Ils sont également supposés enclencher les mécanismes régulateurs du vieillissement.

3. 1. 4.2. Conséquences biologiques

Elles seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôts de lipides oxydés, immunosuppression.

3. 2. Défense de l'organisme contre le stress oxydatif

Pour protéger ses tissus contre les effets nocifs des radicaux libres, l'organisme possède des mécanismes de riposte anti-radicalaire polymorphe, à la fois préventifs et curatifs (Haliwell, 1994). Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat. Cette définition s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques tels que l'hème

oxygénase, la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion réductase et la glutathion peroxydase et des mécanismes non enzymatiques tels que les chélateurs de métaux de transition, la céruloplasmine, la ferritine, la métallothionéine, l'albumine et la bilirubine.

Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et qui jouent le rôle de piègeur ou éboueur (« scavenger » pour les Anglo-saxons) ; le plus important est le glutathion réduit (GSH) qui protège non seulement contre les radicaux libres, mais aussi contre les peroxydes ou le radical monoxyde d'azote. D'autres antioxydants exogènes apportés par l'alimentation participent à la neutralisation des radicaux libres qui sont hydro- ou liposolubles tels que l'acide ascorbique, l' α -tocophérol, le β -carotène et les flavonoïdes.

Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires. Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés (antioxydants primaires) ou en épurant les radicaux libres oxygénés (antioxydants secondaires). En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire.

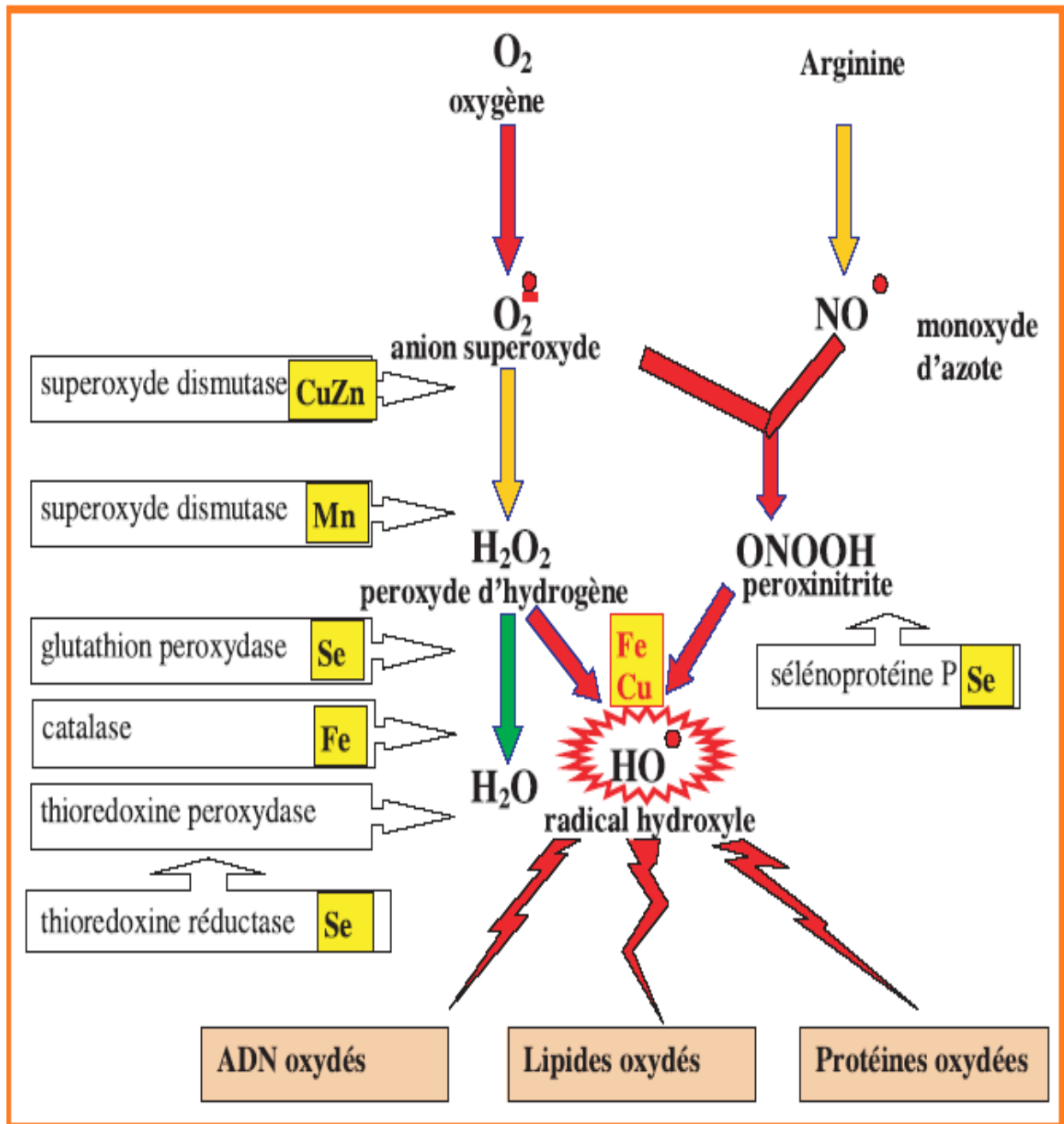


Figure 20 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

3. 2.1. Les antioxydants endogènes enzymatiques

3. 2.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme assure l'élimination par dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), première espèce toxique formée à partir de l'oxygène.

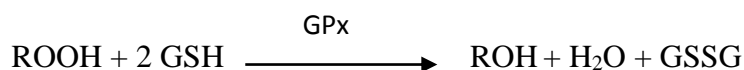
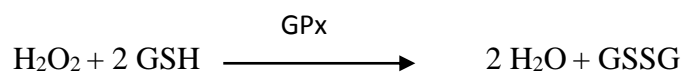
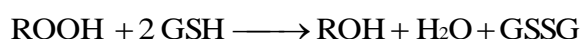
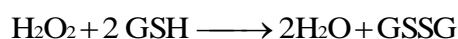


Elle assure ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant. La SOD a besoin d'oligo-éléments comme le cuivre et le zinc (Cu-ZnSOD présente dans le cytosol) ou le

manganèse (MnSOD présente dans la mitochondrie) pour fonctionner correctement. Il existe aussi une SOD extracellulaire (**Figure 20**).

3. 2.1.2. La glutathion peroxydase (GPx)

Son rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx catalyse, en présence de glutathion réduit (GSH) la réduction des hydroperoxydes.

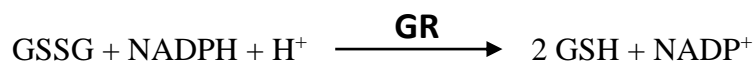


(Où ROOH = hydroperoxydes organiques)

Cette enzyme a besoin du glutathion et du sélénium pour fonctionner correctement. C'est une protéine contenant quatre atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de séléno-cystéine (**Figure 20**).

3. 2.1.3. La glutathion réductase (GR)

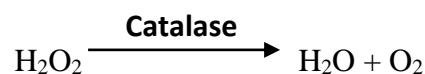
Le rôle de la glutathion réductase est de régénérer le glutathion réduit. Dans le cadre de cette réaction, la glutathion réductase utilise un cofacteur le NADPH. La glutathion réductase se retrouve dans le cytosol et dans les mitochondries, donc où il se trouve la glutathion peroxydase.



Cette réaction produit du NADP^+ qui sera régénéré en NADPH pour une utilisation ultérieure, par une autre enzyme, la glucose-6-phosphate-déhydrogénase (G6PD).

3. 2.1.4. La catalase

Le rôle de la catalase est d'accélérer la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (**Figure 21**).



La plupart des cellules aérobiques (présence de dioxygène) contiennent cette enzyme. Elle a une forte concentration dans le foie et dans les globules rouges. Au niveau sub-cellulaire, la catalase se retrouve dans le cytosol et dans les peroxysomes (**Figure 20**).

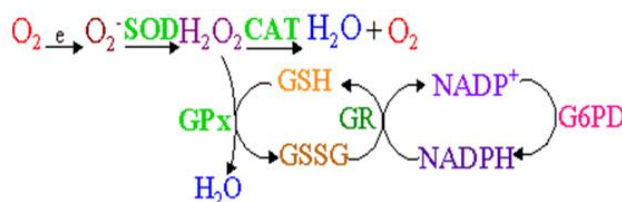


Figure 21: Réactions chimiques liées aux antioxydants.

3. 2.2. Les antioxydants endogènes non enzymatiques

3. 2.2.1. Le glutathion

Il s'agit d'un tripeptide (γ -glutamyl-cystényl-glycine) qui joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant. Le glutathion (GSH) peut interagir directement avec les espèces oxygénées activées mais il est principalement utilisé comme substrat de la GPx qui assure l'élimination des lipides peroxydés. Le glutathion participe à l'élimination de HO[•] en formant un radical thyl (GS[•]). Il joue également un rôle clé dans l'expression de gènes codant pour des protéines pro – et anti – inflammatoires. Des concentrations trop basses en GSH conduisent à une diminution de la défense immunitaire.

3. 2.2.2. L'acide urique

L'acide urique constitue le produit terminal majeur du métabolisme des purines chez les primates. Possédant des propriétés antioxydantes, il peut interagir avec les radicaux libres, et tout particulièrement avec le radical hydroxyle. Il apparaît comme étant l'antioxydant plasmatique le plus efficace en terme de réactivité avec les radicaux libres. Toutefois, ses produits d'oxydation comme l'allantoïne, peuvent facilement s'oxyder en générant à leur tour des espèces toxiques de l'oxygène. L'acide urique augmente lors d'un stress oxydant, principalement lors de phénomène d'ischémie-reperfusion.

3. 2.2.3. La bilirubine

Grâce à la chaîne ouverte tétraprolique, elle se débarrasse de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), ainsi elle est capable d'inhiber efficacement la peroxydation lipidique au niveau des solutions homogènes et les liposomes.

3. 2.2.4. La céruloplasmine

C'est une glycoprotéine sérique fortement concentrée en cuivre. Elle présente un rôle antioxydant indirect par son activité « ferro-oxydasique » : en oxydant le fer réduit ferreux (Fe^{2+}) indispensable pour la réaction de HABER-WEISS génératrice de HO^\bullet en fer ferrique (Fe^{3+}) inactif, et empêche de cette façon la peroxydation.

3. 2.3. Les antioxydants exogènes non enzymatiques

3. 2.3.1. La vitamine E (α -tocophérol)

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols. Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. De tous les tocophérols, ce sont l'alpha et le gamma qui possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes.

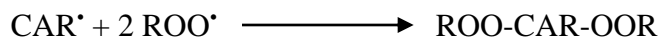
3. 2.3.2. La vitamine C (Acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique n'est pas synthétisée par l'organisme. Sa concentration plasmatique dépend fortement de l'alimentation et des modifications du flux hépatique. C'est un excellent piègeur de radicaux libres oxygénés surtout le radical hydroxyle qui peut protéger divers substrats biologiques de l'oxydation. Aux concentrations physiologiques, la vitamine C est capable d'empêcher l'oxydation des LDL produite par divers systèmes générateurs de radicaux libres (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée.

3. 2.3.3. La vitamine A et les caroténoïdes

Par dégradation, certains caroténoïdes comme le β -carotène servent de précurseurs à la vitamine A dont le rôle est primordial dans la perception visuelle. La plupart des caroténoïdes et vitamine A interagissent avec l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés. Le β -carotène agit directement avec le radical peroxy ROO^\bullet pour former un radical stabilisé par résonance centrée

sur l'atome de carbone. Dans ce cas la β -carotène serait capable de neutraliser deux radicaux peroxylys.



3. 2.3.4. Les oligo-éléments

Les éléments en traces essentiels se définissent comme des constituants, métaux ou métalloïdes, présents dans les organismes vivants en très faibles quantités mais indispensables à leur fonctionnement. Les oligo-éléments, zinc (Zn), cuivre (Cu), manganèse (Mn) et sélénium (Se) ne sont pas en tant que tels des antioxydants mais ils participent au processus de défense contre les radicaux libres oxygénés comme co-facteurs de la superoxyde dismutase et de glutathion peroxydase. Une déficience en l'un ou l'autre de ces éléments diminue la protection cellulaire et va concourir au développement de pathologies radicalaires.

3. 3. Évaluation du stress oxydant

La mesure directe des radicaux libres est possible par résonance para-électronique ou chimiluminescence, mais difficilement utilisable en biologie clinique vu que la courte demi-vie des radicaux libres de l'oxygène est incompatible avec le temps d'une prise de sang et de son transport dans le laboratoire (Favier, 2003). Pour cette raison, pour évaluer le stress oxydant, les biologistes ont opté pour la mesure des produits de l'oxydation par les radicaux libres. Les marqueurs les plus significatifs sont la mesure des composés résultant de la peroxydation lipidique tel que le malondialdéhyde (MDA) (Lefèvre et coll., 1998). L'appréciation des capacités antioxydantes de l'organisme, peut elle aussi être un indice du stress oxydant.

3. 4. Diabète gestationnel, macrosomie et stress oxydatif

De nombreuses études montrent une augmentation des marqueurs du stress oxydatif au cours du diabète de type 2 (Ceriello et coll., 1996; Dandona et coll., 1996; Leinonen et coll., 1997; Nourooz-Zadeh et coll., 1995; Thornalley et coll., 1996), ainsi qu'une diminution des mécanismes de défense vis-à-vis des radicaux libres (Opara et coll., 1999; Rehman et coll., 1999; Santini et coll., 1997; Yoshida et coll., 1995), associée à une diminution du taux d'acide urique et d'acide ascorbique circulant (Maxwell et coll., 1997a; Sundaram et coll., 1996; Will and Byers, 1996). On observe également une diminution de la superoxyde dismutase et de la catalase chez des patients ne présentant qu'une intolérance au glucose, chez qui une diminution de l'acide ascorbique et du glutathion réduit est également déjà présente (Vijayalingam et coll., 1996). (Paolisso et coll., 1994b), ont observé qu'il existait une corrélation positive entre les radicaux libres plasmatiques et l'insulinémie à jeun, et une corrélation négative avec l'utilisation du glucose, en particulier son utilisation non oxydative, dont la diminution est un élément essentiel de la physiopathologie du diabète de type 2. Il est possible que cette anomalie

du statut oxydatif au cours du diabète de type 2 soit secondaire à l'hyperglycémie (bien que comme on l'a vu, elle est déjà observée en cas de simple intolérance au glucose) : on trouve une corrélation négative entre le taux d'hémoglobine glyquée et l'activité de "scavenger" du plasma vis-à-vis des radicaux libres, le taux d'acide urique (Maxwell et coll., 1997b), et un traitement intensif du diabète améliore les taux circulants de malonyldialdéhyde (MDA) (Wierusz-Wysocka et coll., 1995). A court terme, une simple hyperglycémie provoquée par voie orale diminue les défenses antioxydantes de l'organisme chez des sujets sains ou diabétiques non insulino-dépendants (Ceriello et coll., 1998).

Par ailleurs, plusieurs publications démontrent qu'un traitement antioxydant améliore la sensibilité des tissus à l'insuline dans le diabète de type 2. (Paolisso et coll., 1993), ont observé qu'un traitement par la vitamine E augmente l'utilisation globale du glucose, et en particulier son utilisation non oxydative. Le même groupe a montré les mêmes effets avec la vitamine C sur la sensibilité à l'insuline, observant de plus une amélioration des lipides circulants (Paolisso et coll., 1994a); sous l'effet du traitement, les radicaux libres circulants avaient diminués (Paolisso et coll., 1995). L'effet d'un traitement par la silymarine, un agent antioxydant, a été observé chez des patients diabétiques cirrhotiques traités par l'insuline, entraînant une diminution des besoins en insuline exogène (Velussi et coll., 1997). Les patients diabétiques de type 2 ont un taux de glutathion réduit dans les érythrocytes diminué, et la perfusion de glutathion réduit augmente l'utilisation du glucose au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (De Mattia et coll., 1998).

Curieusement, face d'une part à ces études montrant un effet sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline d'un traitement par les antioxydants, et d'autre part aux nombreuses évidences, mentionnées plus haut, impliquant les radicaux libres dans la destruction des îlots dans le diabète de type 1, *il y a, à notre connaissance, peu d'études cliniques sur le statut antioxydant et sur l'amélioration de l'insulino-sécrétion dans le diabète gestationnel et la macrosomie*. Il a été démontré que les fœtus des mères souffrant d'un diabète gestationnel ont un risque accru à développer une macrosomie fœtale associée à un stress oxydatif (Kamath et coll., 1998). L'hyperglycémie observée chez les nouveaux-nés induit un stress oxydatif qui, en retour, entraîne la production de radicaux oxygénés toxiques aux lipides membranaires cellulaires.

Il est possible que les radicaux libres interviennent chez l'homme dans l'apparition des troubles de l'insulino-sécrétion et de la sensibilité à l'insuline qui caractérisent le diabète de type 2. D'une part, les cellules β sont très sensibles au stress oxydatif et d'autre part, de

nombreuses données expérimentales indiquent que ce dernier pourrait représenter un mécanisme par lequel l'hyperglycémie chronique aggrave la fonction insulino-sécrétoire dans le diabète de type 2. Une publication récente, montrant que la metformine protège les îlots contre les effets délétères des lipides sur la sécrétion d'insuline par des îlots isolés (Patane et coll., 2000), suggère que le stress oxydatif pourrait également jouer un rôle dans les mécanismes de la lipotoxicité au niveau de la cellule β .

A ce jour l'effet bénéfique des antioxydants n'a été montré chez l'homme qu'en ce qui concerne l'autre versant de ce syndrome bipolaire que représente le diabète, c'est-à-dire l'insulino-résistance. Si cette hypothèse est vérifiée, une intervention à ce niveau par un traitement antioxydant pourrait freiner le passage de l'intolérance au glucose au diabète, voire chez des sujets obèses qui ont des taux élevés d'acides gras libres, supprimer ou ralentir l'apparition du trouble de l'insulino-sécrétion qui conduit à la détérioration de l'homéostasie glycémique.

*L'expression des facteurs de croissance
dans le diabète gestationnel*

Chapitre IV

CHAPITRE 4

L'expression des ARNm des facteurs de croissance et de leurs récepteurs placentaires dans le diabète gestationnel.

4.1. Mécanismes d'action des facteurs de croissance, de l'hormone de croissance et de leurs récepteurs

4. 1. 1. Notions générales

Le nombre total de cellules d'un organisme humain adulte a pu être estimé à environ 10^{18} . Toutes ont pour origine une cellule unique, l'œuf fécondé. Au cours de l'embryogenèse puis de la croissance interviennent donc un très grand nombre de divisions cellulaires. De même, dans un organisme adulte, des divisions cellulaires interviennent également, mais elles sont en nombre moins important. Elles peuvent simplement servir à renouveler les cellules arrivées au terme de leur existence.

Dans les tissus normaux, les divisions cellulaires sont l'objet d'un contrôle strict par des molécules polypeptidiques circulant à l'extérieur des cellules et appelées facteurs de croissance. Très nombreuses sont les différentes formes de facteurs de croissance qui ont été isolées et nous nous limiterons, dans ce chapitre, à ceux d'entre eux qui ont une relation directe ou indirecte avec le métabolisme glucidique.

4. 1. 1. 1. Mode d'action des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance polypeptidiques sont formés selon les mécanismes de la synthèse protéique (**Figure 22**), soit directement, soit sous forme de précurseurs clivés en polypeptides définitifs par des protéinases. En général, ils sortent de la cellule formatrice et se fixent sur des récepteurs membranaires des cellules voisines, sans passer par la circulation générale : c'est le mode d'action *paracrinie*.

Dans certains cas, le facteur de croissance est sécrété mais peut revenir pour agir sur la cellule même qui l'a synthétisé : on parle d'*autocrinie*.

Parfois, enfin, le polypeptide n'a pas besoin d'être sécrété pour être actif il peut rester inséré dans la membrane de la cellule qui le synthétise, c'est le domaine extracellulaire qui est responsable de l'activité : on appelle ce phénomène *juxtacrinie*.

Dans tous les cas, le facteur de croissance vient se fixer sur un récepteur à haute affinité présent à la surface cellulaire (Gaillard, 2000).

Sauf exception, les récepteurs des facteurs de croissance sont formés d'une seule chaîne polypeptidique traversant une seule fois la membrane plasmique. La portion intracellulaire possède un domaine à activité protéine-kinase. La fixation sur le récepteur provoque des phénomènes de phosphorylations intracellulaires aboutissant à l'activation de la voie des MAP-kinases qui déclenche l'entrée dans le cycle de division cellulaire (Borel et coll., 1997).

Figure 22: En général les facteurs de croissance polypeptidiques sortent de la cellule formatrice et se fixent sur des récepteurs membranaires des cellules voisines, sans passer par la circulation générale : c'est le mode d'action *paracrine*.

Dans certains cas, le facteur de croissance est sécrété mais peut revenir pour agir sur la cellule même qui l'a synthétisé : on parle d'*autocrinie*.

Parfois, enfin, le polypeptide n'a pas besoin d'être sécrété pour être actif il peut rester inséré dans la membrane de la cellule qui le synthétise, c'est le domaine extracellulaire qui est responsable de l'activité : on appelle ce phénomène *juxtacrine*. (HPL : Hormone Placentaire Lactogène)

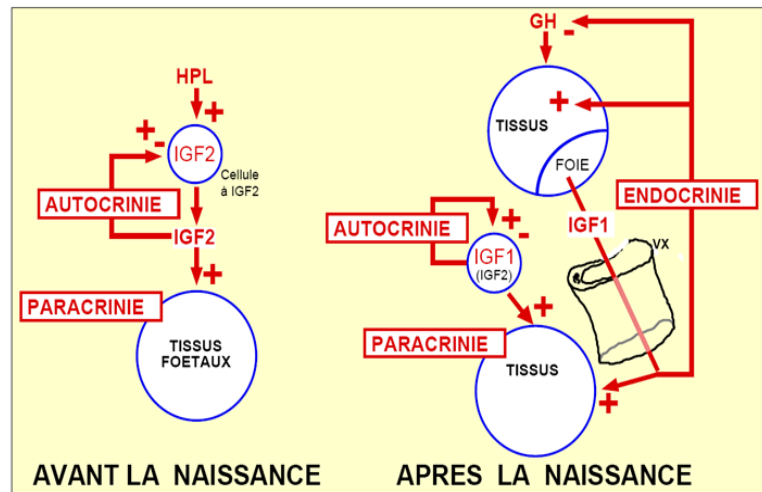


Figure 22: Mode d'action des facteurs de croissance IGFs avant et après la naissance (embryologie.ch, 2009).

4. 1. 1. 2. Complémentarité des facteurs de croissance

Dans la plupart des cas, l'action d'un seul facteur ne suffit pas à provoquer la division cellulaire. Un premier facteur prépare la cellule en modifiant son métabolisme, un second facteur déclenche la division. On a ainsi réparti les facteurs de croissance en deux groupes : *facteurs de compétence* qui mettent la cellule en état de se diviser, et *facteurs de progression* qui la font avancer dans son cycle. Les deux types de facteurs ne doivent pas obligatoirement être présents simultanément dans l'environnement cellulaire : une cellule rendue compétente peut le rester plusieurs heures après l'application du facteur adéquat, et donc être capable de répondre à la stimulation par un facteur de progression bien après que le facteur de compétence ait disparu du milieu (Borel et coll., 1997).

4. 1. 1. 3. Effets biologiques des facteurs de croissance

4. 1. 1. 3. 1. Facteur de croissance ressemblant à l'insuline : IGF-I

A/-Structure

L'IGF-I, abréviation de l'anglais (*insulin-like growth factor 1*), est constitué d'une chaîne polypeptidique, non glycosylé, de 70 acides aminés et avec une masse moléculaire de 7649 Da. Le polypeptide contient 3 ponts disulfures intra-chaînes qui donnent à la molécule la forme d'une boucle (**Figure 23**). Il est organisé en quatre domaines A, B, C, D : les domaines

A et B sont analogues des domaines A et B de l'insuline. Le domaine C est analogue au C-peptide de la pro-insuline. Le domaine D est spécifique des IGFs (Binoux, 1995; Humbel, 1990).

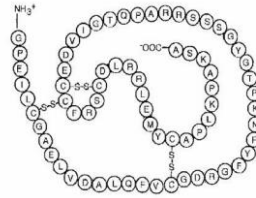


Figure 23: Structure d'IGF-I (Gaillard, 2001).

B/-Biosynthèse

La production d'IGF-1 est pratiquement ubiquitaire mais les principaux organes producteurs sont : pour 50% au niveau hépatique et pour 50% dans les chondrocytes des cartilages de croissance, les fibroblastes, le muscle, les poumons et les reins (Binoux, 1996).

La synthèse d'IGF-1 a lieu dans les cellules mésenchymateuses, notamment celles qui sont présentes dans le foie. Le gène d'IGF-1 est localisé sur le chromosome 12 chez l'Homme. Il code pour un précurseur, le pro-IGF-1, de 130 acides aminés, dont les 25 acides aminés N-terminaux constituent la séquence-signal. Celle-ci est suivie par les 70 résidus d'acides aminés du facteur de croissance mature, lui-même suivi d'un pro-peptide C-terminal (**Figure 23**).

C/-Mode d'action

Deux types de récepteurs, appelés récepteurs de type I et de type II, ont été décrits pour les IGFs chez les mammifères.

La structure du récepteur de type I est extrêmement voisine de celle du récepteur d'insuline (**Figure 24**). Il est formé de 4 sous-unités : 2 sous-unités α , extracellulaires, de masse moléculaire 130 kDa et 2 sous-unités β , à une seule traversée de membrane, de 95 kDa. Le domaine intracellulaire de la sous-unité β , qui représente environ les deux tiers de la molécule, contient un domaine possédant une activité de tyrosine-protéine-kinase.

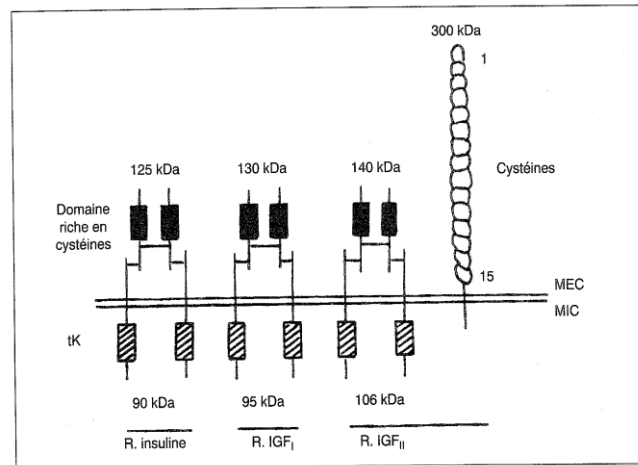


Figure 24: Structure des récepteurs à IGFs et de l'insuline (embryologie.ch, 2009).

Comme pour le récepteur de l'insuline, les deux types de sous-unités sont codés par un gène unique (celui-ci est situé sur le chromosome 15 chez l'Homme, alors que celui de l'insuline est porté par le chromosome 19), qui donne naissance, après clivage d'une séquence signal de 30 résidus, à un précurseur de 1337 acides aminés. Le précurseur est clivé par des protéinases spécifiques pour donner les sous-unités α et β matures, qui restent unies par des ponts disulfures (Borel et coll., 1997).

Ce récepteur fixe IGF-1 et IGF-II avec les mêmes affinités. Il est également capable de fixer l'insuline, mais avec une affinité 500 à 1000 fois plus faible. Cette possibilité de se fixer sur le récepteur d'IGF explique, au moins en partie, les effets mitogènes de l'insuline à forte concentration. La fixation du ligand se fait sur les sous-unités α et implique au moins deux domaines différents de chacune d'elles.

La fixation d'IGF sur les récepteurs de type 1 (**Figure 25**) induit une dimérisation de ceux-ci et leur phosphorylation réciproque sur des résidus de tyrosine. La voie de la phosphatidyl-inositol-3-kinase et celle des MAP-kinases se trouvent ainsi activées, aboutissant à l'effet mitogène (Murphy et coll., 2006).

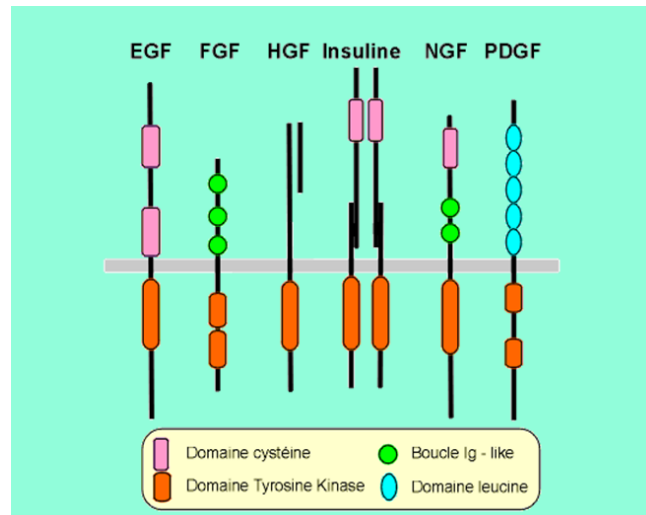


Figure 25: Représentations schématiques des différents récepteurs avec leur partie extra-cytoplasmique (vers le haut) et leur partie intra-cytoplasmique, essentiellement constituée par différents domaines tyrosine-kinase.

D/-Effets biologiques

Les IGFs étaient connus de longue date, sous la dénomination de « somatomédines », pour leur effet stimulant sur l'incorporation de sulfate dans les protéo-glycannes du cartilage. Ce n'est que secondairement que leur rôle de facteur de croissance a été mis en évidence.

In vitro, les IGF sont des facteurs de progression et stimulent la prolifération des chondrocytes, des fibroblastes et de nombreuses cellules d'origine mésenchymateuse (De Meyts P, 1994). Ils stimulent également la synthèse protéique, notamment celle des macromolécules de la matrice extracellulaire (collagènes, protéoglycannes).

En raison de leur similitude structurale avec l'insuline, les IGF sont également capables de reproduire en partie les effets métaboliques de celle-ci en se fixant sur son récepteur, en particulier la stimulation de la pénétration du glucose et de la dégradation de celui-ci dans les cellules-cibles, ainsi que de la synthèse de glycogène et la lipogenèse (Murphy et coll., 2006). On notera que la fixation de la quasi-totalité des IGF plasmatiques sur leurs protéines de transport spécifiques explique que ces facteurs ne soient responsables que d'une très faible partie (1-2 %) des effets métaboliques de l'insuline alors qu'ils sont en concentration 1000 fois supérieure à cette dernière dans le plasma (de l'ordre de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contre 1 ng/mL).

In vivo, il est démontré qu'IGF-I stimule la croissance de l'enfant (De Meyts P, 1994). Un déficit de la sécrétion d'IGF-I est responsable de certaines formes de nanisme. Inversement, des taux plasmatiques élevés d'IGF-I sont trouvés dans une maladie, l'acromégalie, qui est caractérisée, entre autres, par un gigantisme.

E/-Analogie entre les mécanismes d'action de l'insuline et d'IGFs

La liaison des IGFs aux récepteurs tétramériques provoque l'activation des unités Tyrosine-kinase (TK) par des mécanismes d'autophosphorylation des unités β . A partir de cette activation, des cascades phosphorilantes vont suivre des voies différentes (**Figure 26**):

- **Une voie mitotique**, via les Map-K. Cette voie est potentialisée par la mobilisation du Ca^{2+} et la mise en jeu de kinases calcium dépendantes (via l'hydrolyse du PiP_2 en IP_3). Elle est aussi facilitée par une alcalinisation intracellulaire via la stimulation d'un antiport permettant la sortie du proton H^+ , échangé contre le Ca^{2+} .
- **Des voies métaboliques** où l'activité kinasique facilite la glycogénèse via la glycogène synthétase ; mais aussi l'entrée dans le cycle de Krebs à partir du pyruvate, via la pyruvate déshydrogénase (PDH) (= voie de la glycolyse).

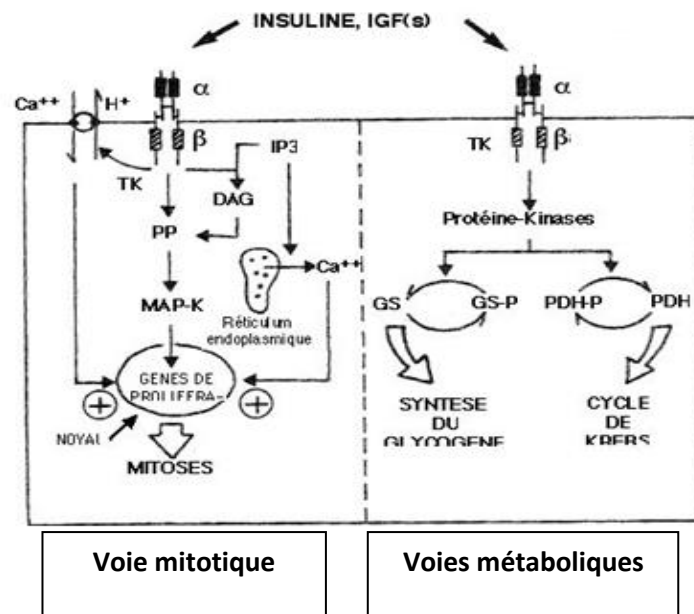


Figure 26 : Mécanisme d'action de l'insuline et d'IGFs simplifié (embryologie.ch, 2009).

4. 1. 1.4.2. Protéine de transport des IGF-I : IGF-BP3

A/-Structure

Dans le plasma, les IGF sont fixés sur des protéines de transport spécifiques (IGF-binding protéines, IGF-BP). Il existe deux types majeurs de complexes entre IGF et ces protéines de transport, l'un de faible masse moléculaire (40-50 kDa), l'autre de masse moléculaire élevée (environ 150 kDa). C'est ce dernier qui fixe la majeure partie des IGF circulant. Trois IGF-BP majeures ont pu être isolées : IGF-BP1, de masse moléculaire 30 kDa, est présente dans le complexe de faible masse moléculaire ; IGF-BP3, présente dans le complexe de masse moléculaire élevée, est constituée de deux sous-unités, une sous-unité α de

masse moléculaire 80-85 kDa et une β de 30 kDa. L'IGF-BP2, de 30 kDa, fixe spécifiquement IGF-II.

B/-Biosynthèse

L'IGFBP-3 est sécrétée par les cellules d'adénocarcinome de la prostate (PC-3).

C/-Mode d'action

L'IGFBP-3 et les IGF circulent dans le sang sous la forme d'un complexe de 150 kDa qui est sous la dépendance de l'hormone de croissance (White et coll., 1981).

D/-Effets biologiques

Les IGFBP ont différentes fonctions. La plus importante est la mise en réserve des IGFs et leur transport dans le sérum (Jones et coll., 1991).

Au niveau cellulaire, elles contrôlent la biodisponibilité des IGF secrétés localement. Elles peuvent inhiber la croissance cellulaire en séquestrant les IGF et en les empêchant de se lier à leur récepteur. Mais elles peuvent aussi avoir un effet inhibiteur, indépendant de leur propriété de se lier aux IGFs. A l'inverse, elles peuvent potentialiser la réponse mitogène des IGFs dans certaines conditions.

L'IGFBP-3 peut être sous forme phosphorylée, mais on n'a pas montré que sa phosphorylation modifie son activité (Hoeck and Mukku, 1994). C'est une protéine particulièrement intéressante car elle est multifonctionnelle. D'une part, elle lie avec une bonne affinité les IGFs et inhibe leur effet stimulant en les maintenant captifs et ainsi en les empêchant d'atteindre leur récepteur (Blat et coll., 1989; De Mellow and Baxter, 1988). D'autre part, elle peut aussi potentialiser les IGF.

De Mellow et Baxter (De Mellow and Baxter, 1988) ont montré que l'ajout simultané d'IGFBP-3 et d'IGF à des fibroblastes inhibait la synthèse de l'ADN induite normalement par les IGF. En revanche, IGFBP-3 stimulait l'effet des IGF quand les cellules étaient pré-incubées en sa présence et avant l'ajout d'IGF. Conover et coll.,(1990), ont retrouvé dans un modèle de fibroblastes bovins le phénomène décrit par Baxter et coll., ont montré que les pré-incubations des fibroblastes avec l'IGFBP-3 induisaient, d'une part, une dégradation ménagée de l'IGFBP-3, et d'autre part, sa liaison à la membrane.

Le fragment d'IGFBP-3 a une affinité pour les IGF plus faible que celle de la molécule entière, mais cette affinité serait suffisante pour concentrer l'IGF à la membrane, favorisant ainsi sa liaison à son récepteur.

L'IGFBP-3 est aussi un inhibiteur bi fonctionnel. Notons, en particulier, qu'elle est capable d'inhiber la prolifération des cellules de prostate normale en présence d'insuline (Kaicer et coll., 1993), c'est-à-dire dans les conditions où les récepteurs d'IGF sont bloqués. Elle inhibait aussi la prolifération des fibroblastes induite par le FGF (*fibroblast growth factor*) (Villaudy et coll., 1991). En revanche, elle n'inhibait pas la stimulation induite par le PDGF « *platelet-derived growth factor* » ou l'EGF (*epidermal growth factor*) (Villaudy et coll., 1991).

Sa propriété de lier l'IGF ne permettait pas d'expliquer l'inhibition totale, par l'IGFBP-3, de la stimulation de la prolifération induite par le sérum (Blat et coll., 1989). Par la suite, il était montré que l'IGFBP-3 inhibait la stimulation induite par une fraction protéique sérique de haut poids moléculaire et dépourvue d'IGF (Liu et coll., 1992). Il faut aussi signaler un travail de C. Lalou et M. Binoux (1994) montrant qu'un fragment d'IGFBP-3 de 16 kDa (obtenu après protéolyse ménagée de l'IGFBP-3 par la plasmine) n'a pas la propriété de lier les IGF mais est capable d'inhiber la stimulation de la croissance cellulaire induite par l'insuline dans les fibroblastes d'embryon de poulet (Binoux et coll., 1994). L'ensemble de ces résultats met en évidence un effet inhibiteur de l'IGFBP-3 indépendant de sa propriété de lier les IGF.

4. 1. 1.4.3. Facteur de croissance épidermique : EGF

A/-Structure

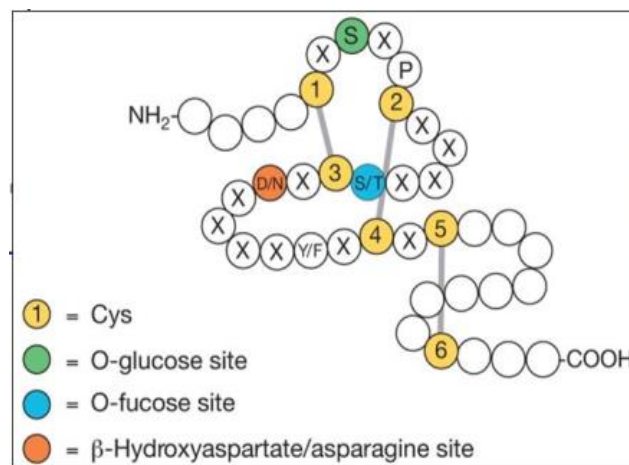


Figure 27: Structure de l'EGF.

L'EGF humain est composé d'une seule chaîne polypeptidique de 53 acides aminés avec 3 ponts disulfure intra-chaîne (**Figure 27**). La présence de ces ponts disulfures est indispensable à l'activité biologique du polypeptide. Elle disparaît si ceux-ci sont réduits.

B/-Biosynthèse

La synthèse de EGF a pu être démontrée dans de nombreux tissus humains normaux (Loukovaara et coll., 2004), notamment glande sous-maxillaire, duodénum, pancréas, jéjunum,

thyroïde, rein. Par ailleurs, EGF est fortement exprimé au cours des phénomènes de réparation tissulaire impliquant la migration et la prolifération de cellules épithéliales. Dans ce cas sa source principale est constituée par les plaquettes sanguines, les macrophages et les cellules épithéliales elle-même (phénomène d'activation autocrine).

Le gène codant l'EGF humain est situé sur le chromosome 4. L'ARN messager correspondant est composé de 4750 nucléotides et contient la séquence d'un précurseur, le pré-pro-EGF qui contient 1217 acides aminés (masse moléculaire 133 kDa).

Après la synthèse protéique, pro-EGF, contenu dans des vésicules, est transféré jusqu'à la membrane des cellules qui l'ont synthétisé (Borel et coll., 1997). Il y reste ancré par un court domaine transmembranaire situé dans le pro-peptide C-terminal. L'EGF mature est ensuite libéré par des protéinases extracellulaires. Le pro-EGF ancré dans la membrane est capable de se lier à un récepteur d'EGF situé à la surface d'une cellule voisine et d'exercer sur celle-ci des effets biologiques identiques à ceux d'EGF mature. Il s'agit là d'un exemple de régulation juxtacrine.

C/-Mode d'action

EGF se fixe à un récepteur spécifique de la membrane des cellules cibles, dont le gène est porté par le chromosome 7 chez l'Homme ; c'est une glycoprotéine de masse moléculaire 170 kDa, formée d'une seule chaîne polypeptidique de 1188 acides aminés, repliée en 3 domaines (**Figure 26**). Le premier, N-terminal, est extracellulaire. Il comporte 621 acides aminés, contient de nombreux ponts disulfures et porte 12 sites de glycosylation. C'est lui qui est capable de fixer l'EGF, le second, composé de 25 acides aminés à caractère hydrophobe marqué, forme une hélice transmembranaire. Le troisième, C-terminal, de 542 résidus, est intracellulaire et possède une activité de tyrosine-protéine-kinase.

EGF se fixe sur son récepteur avec une affinité élevée ($K_d = 3,5 \times 10^{-10}M$). Le nombre moyen de sites de fixation pour EGF sur des fibroblastes humains a pu être évalué à environ 90 000 par cellule. La fixation d'EGF sur les cellules ne peut avoir lieu que si le récepteur d'EGF est correctement glycosylé.

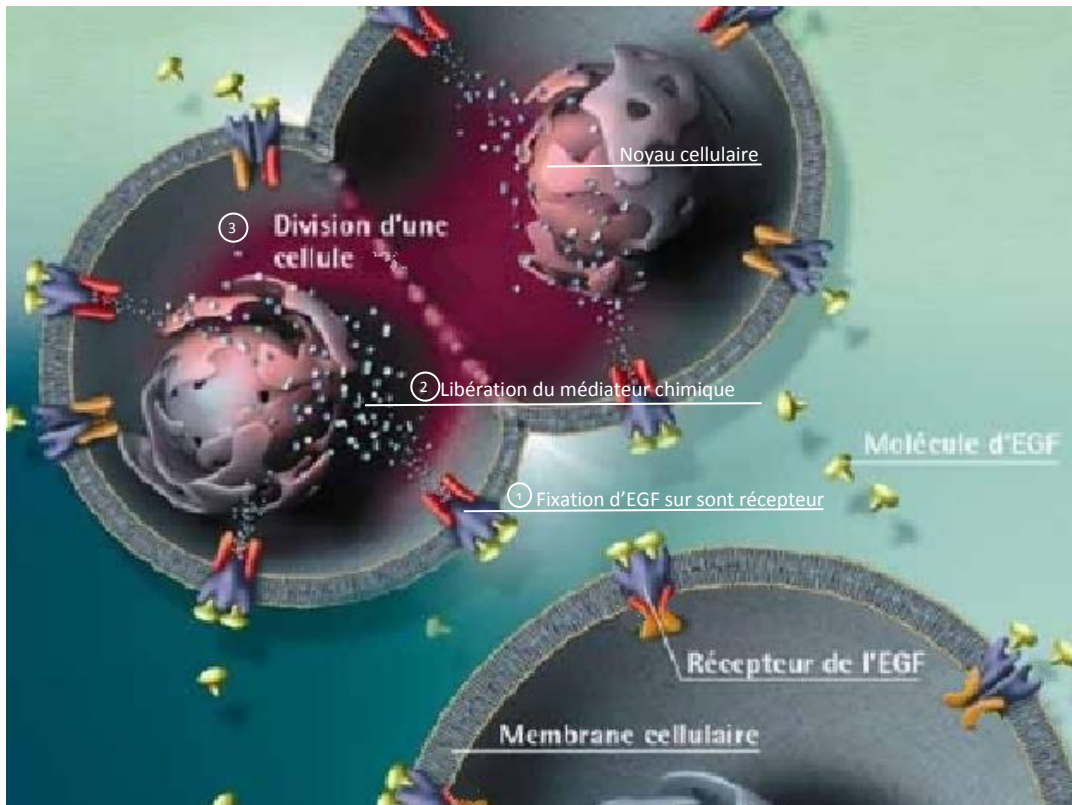


Figure 28 : Mode d'action des EGF au niveau cellulaire.

Dès qu'elles se sont fixées sur leurs sites, les molécules d'EGF provoquent la dimérisation des récepteurs (**Figure 28**), qui s'associent par paires, et rapprochent leurs domaines protéine-kinasiques intracellulaires (Goldkorn et coll., 1997) : les récepteurs dimérisés peuvent ainsi se phosphoryler réciproquement sur certains résidus de tyrosine.

La fixation d'EGF sur son récepteur et l'autophosphorylation qui s'ensuit sont le préalable indispensable du déclenchement dans la cellule-cible des mécanismes de transduction du signal. Les récepteurs liés à EGF se regroupent ensuite en certains points de la membrane plasmique et sont internalisés dans la cellule-cible. Ils sont finalement dégradés par les enzymes lysosomiales (seule une faible proportion des récepteurs peut être recyclée à la surface cellulaire). Cette internalisation et la dégradation suivante sont un moyen très efficace de limiter la réponse d'une cellule à un facteur de croissance donné : lorsqu'il n'y a plus de récepteur disponible à sa surface, la cellule cesse de répondre à la stimulation, même s'il reste un excès de facteur de croissance libre dans son environnement.

D/-Effets biologiques

In vitro, EGF joue généralement le rôle de facteur de compétence. EGF stimule la prolifération de nombreux types cellulaires d'origine ectodermique ou mésenchymateuse ; kératinocytes, cellules de l'épithélium cornéen, cellules musculaires lisses, chondrocytes, fibroblastes, cellules épithéliales trachéo-bronchiques, cellules épithéliales de la glande mammaire (Masuyama, Hiramatsu, and Kudo, 1996). En plus de cette activité mitogène, EGF possède de nombreuses autres activités biologiques.

Il stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes ; il augmente la kératinisation et la production de squames par les kératinocytes et retarde leur vieillissement en culture, accroissant leur durée de vie totale ; il accélère la différenciation des ébauches dentaires.

In vivo, les effets biologiques d'EGF sont établis dans plusieurs modèles expérimentaux. La perfusion d'EGF à des foetus de mouton stimule la croissance des tissus épidermiques avec augmentation significative des plis cutanés et épaissement des épithéliums bronchiques et colléolaires (Gogg and Smith, 2002). L'application de solution d'EGF sur des ulcères de cornée ou sur des plaies du membre inférieur a provoqué une accélération de la vitesse de cicatrisation.

3. 1. 1.4.4. Facteur de croissance dérivé des plaquettes : PDGF

PDGF (*Platled Derived Growth factor*) a été isolé à partir du sérum des mammifères, il est présent en abondance dans les granules des plaquettes et libéré lors des phénomènes d'agrégation plaquettaire qui surviennent aux phases précoces de l'hémostase.

A/-Structure

PDGF est une glycoprotéine qui existe dans le sérum sous de multiples formes biologiquement activées. Dans sa forme typique, PDGF est un polypeptide de 30 kDa, formé de deux chaînes polypeptidiques unies par des ponts disulfures. Ces chaînes peuvent être de deux types : soit chaîne A de 125 acides aminés, soit chaîne B de 160 résidus, présentant 60 % d'homologie entre elles. Selon la nature des chaînes polypeptidiques constitutives, il existe donc 3 isoformes de PDGF (**Figure 29**): PDGF-AA, PDGF-BB, et PDGF-AB. La forme AB est prédominante dans les plaquettes (AB = 75 %, BB = 20 %, AA = 5 %).

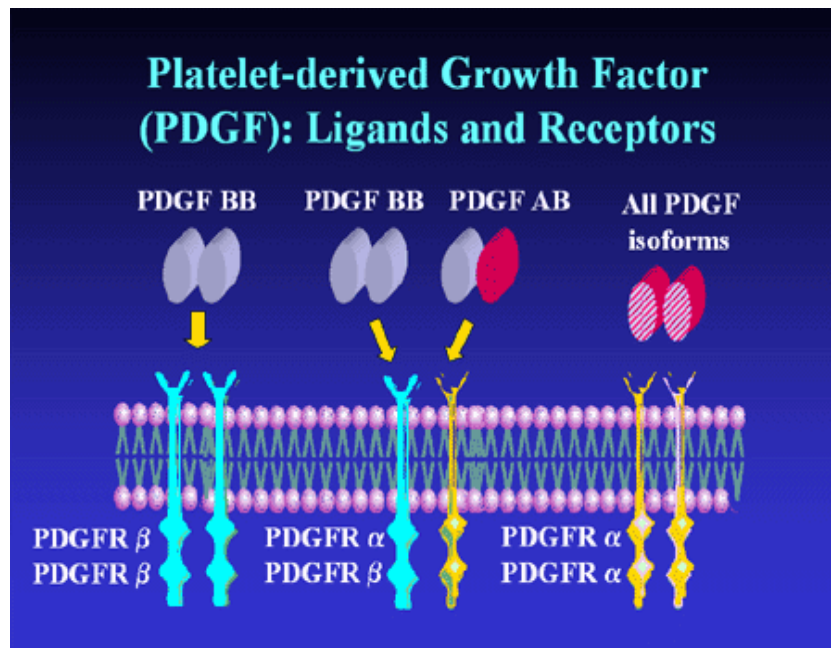


Figure 29: PDGF est une glycoprotéine qui présente de multiples formes biologiquement actives. Dans sa forme typique, PDGF est formé de deux chaînes polypeptidiques unies par des ponts disulfures. Ces chaînes peuvent être de deux types : soit chaîne A de 125 acides aminés, soit chaîne B de 160 résidus. Selon la nature des chaînes polypeptidiques constitutives, il existe donc 3 isoformes de PDGF: PDGF-AA, PDGF-BB, et PDGF-AB.

Figure 29: PDGF ligands et récepteurs.

B/-Biosynthèse

Les principales cellules capables de sécréter PDGF sont les plaquettes sanguines et leurs précurseurs, les mégacaryocytes, les monocytes et macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires de la paroi aortique, les fibroblastes activés par l'interleukine-1 et de nombreuses lignées de cellules malignes (Nystrom et coll., 2006).

Chez l'Homme, le gène codant la chaîne A est situé sur le chromosome 7, celui codant la chaîne B sur le chromosome 22.

C/-Mode d'action

Le récepteur de PDGF est formé de 2 sous-unités de 2 types, α et β (**Figure 29**), de masses moléculaires de l'ordre de 170-190 KDa pour chacune. Il possède une affinité élevée pour PDGF ($K_d = 10^{-9}$ à 10^{-10} M). La sous-unité α est codée par un gène porté par le chromosome 4 chez l'Homme, la sous-unité β par le chromosome 5. Elles possèdent toutes deux un domaine extracellulaire d'environ 500 acides aminés qui fixe PDGF, un domaine transmembranaire d'environ 25 acides aminés et un domaine intracellulaire, d'environ 500 résidus, doué d'une activité de tyrosine-protéine-kinase.

Selon la composition en sous-unités, il existe 3 types de récepteurs (**Figure 29**) : $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, et $\beta\beta$. PDGF-AA ne peut interagir qu'avec le récepteur $\alpha\alpha$, PDGF-AB qu'avec les

récepteurs $\alpha\alpha$ et $\alpha\beta$, alors que PDGF-BB peut interagir aussi bien avec $\alpha\alpha$ qu'avec $\alpha\beta$ ou $\beta\beta$ (Borel et coll., 1997). La réponse à PDGF d'un type cellulaire donné dépend de l'isoforme à laquelle il est exposé et du ou des types de récepteurs qui sont exprimés à sa surface. Cette disposition confère une certaine spécificité cellulaire à l'action de ce facteur de croissance.

Comme dans le cas de l'EGF, la fixation de PDGF sur son récepteur provoque la dimérisation (**Figure 30**) de celui-ci, facilitée par le fait qu'une même molécule de PDGF peut, grâce à ses deux chaînes constitutives, se fixer à deux récepteurs voisins. La fixation du facteur de croissance provoque l'activation du domaine protéine-kinase du récepteur. Les deux récepteurs associés dans le dimère se phosphorylent réciproquement sur le résidu de tyrosine placé en position 857 dans le domaine kinasique de la chaîne polypeptidique.

Le complexe récepteur-PDGF est ensuite rapidement internalisé (50 % des complexes formés disparaissent de la surface cellulaire en 20 minutes) puis dégradé à l'intérieur de la cellule.

D/-Effets biologiques

In vitro, PDGF est un facteur de compétence qui stimule la multiplication des fibroblastes, des chondrocytes, des cellules endothéliales, des cellules gliales et des cellules musculaires lisses. Il a une activité chimiotactique sur les fibroblastes et les polynucléaires. Il exerce également diverses activités métaboliques : il stimule la synthèse de collagénase par les fibroblastes ; il active la formation de cholestérol, de phospholipides et de prostaglandines, ainsi que le transport transmembranaire des acides aminés (Nystrom et coll., 2006).

In vivo, PDGF est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, Ainsi, dans la cicatrisation, il stimule l'arrivée de fibroblastes chargés de reconstruire le tissu lésé et, par son action sur les cellules endothéliales, favorise la formation de néo-vaisseaux. Une augmentation de l'expression de PDGF est observée dans de nombreux processus inflammatoires et fibrotiques (Nystrom et coll., 2006).

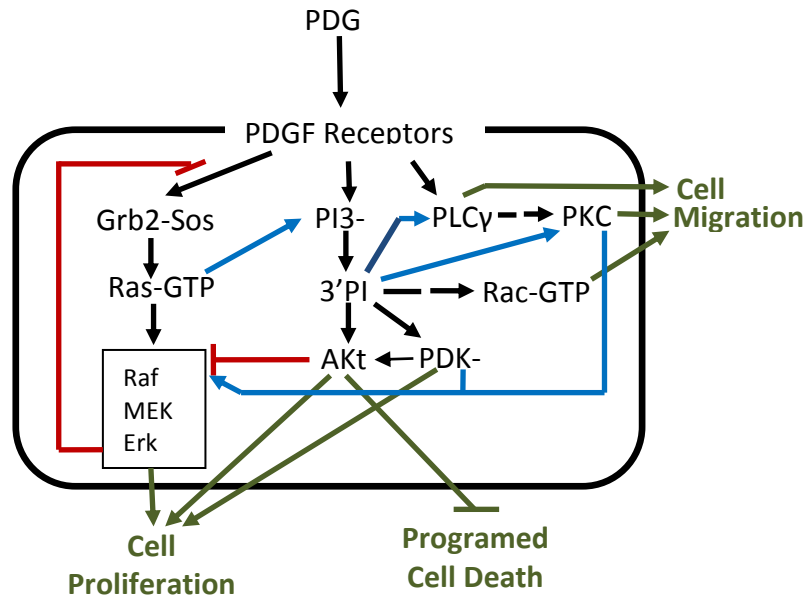


Figure 30: Mécanisme cellulaire d'action de PDGF simplifié (embryologie.ch, 2009).

4. 1. 1.4.5. Facteur de croissance des fibroblastes : FGF-2

Le nom de FGF recouvre à l'heure actuelle une famille de polypeptides exprimés dans de nombreux tissus et possédant des activités biologiques dépassant très largement leur propriété initialement constatée de stimuler la prolifération des fibroblastes. Cette famille comporte actuellement 9 membres.

A/-Structure

Tous les membres de la famille des FGFs sont formés d'une seule chaîne polypeptidique, de longueur très variable.

Dans sa forme mature, FGF 1 est constitué de 140 acides aminés, avec une masse moléculaire de 15,9 kDa. Il a un point isoélectrique de 4,7, ce qui explique son nom traditionnel de FGF acide (aFGF). FGF 2 mature comporte 146 résidus, avec une masse moléculaire de 16,4 kDa et un point isoélectrique de 9,6, d'où son nom usuel de FGF basique (bFGF). Ces deux formes principales possèdent 55 % d'homologie entre elles.

B/-Biosynthèse

Sont synthétisés sous forme de précurseurs de taille très variable, comportant à leur extrémité N-terminale une séquence signal de 25 à 30 acides aminés, à l'exception de FGF 1 et FGF 2 qui n'en possèdent pas. Tous les types de FGF sont exprimés par les tissus embryonnaires à des stades plus ou moins précoces du développement. Seuls quelques uns restent exprimés dans les organismes adultes normaux : FGF 1 est synthétisé spécifiquement

dans le cerveau et l'œil tandis que FGF 2 est produit dans presque tous les tissus adultes. FGF 5 et FGF 6 sont exprimés uniquement dans certains groupes de neurones cérébraux.

On notera que la présence de FGF dans un tissu ne signifie pas que celui-ci y soit présent sous forme soluble. Les FGF, en effet, possèdent une très forte affinité pour les molécules d'héparane-sulfate présentes dans les protéoglycannes de la matrice extracellulaire, en particulier des membranes basales (Borel et coll., 1997). Il semble donc que la majorité des molécules produites soient stockées sous forme de complexe dans la matrice extracellulaire et ne soient libérées qu'en cas de besoin, par exemple lors d'une blessure.

C/-Mode d'action

Au moins sept types de récepteurs à haute affinité pour les FGF ont pu être isolés, avec des masses moléculaires comprises entre 125 et 150 kDa. Ils sont codés par quatre gènes différents, appelés FGFR2, FGFR3 et FGFR4, comportant entre 56 % et 71 % d'homologie entre eux.

Tous les récepteurs de cette famille possèdent la même structure générale. Ils sont formés d'un domaine extracellulaire comportant deux ou trois boucles ressemblant à celles trouvées dans les immunoglobulines, maintenues par des ponts disulfures (**Figure 25**). Le domaine extracellulaire est suivi d'une courte hélice transmembranaire, elle-même suivie d'un domaine intracellulaire possédant une activité de tyrosine-protéine-kinase. Curieusement, le domaine possédant l'activité protéine-kinase (Hill et coll., 1995) est séparé en deux parties par une séquence d'acides aminés ne participant pas à cette activité.

D/-Effets biologiques

Les FGF sont classés dans la catégorie des facteurs de compétence. *In vitro*, FGF 1 et FGF 2 stimulent la prolifération des cellules endothéliales, des cellules surrénales, des myoblastes, des cellules amniotiques, des chondrocytes, des cellules gliales et des fibroblastes. Les deux types de FGF exercent des effets chimiotactiques sur les cellules mésenchymateuses (Borel et coll., 1997).

In vivo, les diverses formes de FGF, notamment FGF 3, 4, 5 et 6 jouent un rôle important dans le contrôle du développement embryonnaire (Hill et coll., 1995). Chez l'adulte, FGF 1, 2 et 7 sont particulièrement impliqués dans le processus de cicatrisation : par leur action sur les cellules endothéliales (stimulation de la prolifération et migration), FGF 1 et 2 permettent la formation de néo-vaisseaux qui viennent de la périphérie remplacer les vaisseaux détruits par la blessure et restaurer l'irrigation des tissus lésés.

4. 1. 1.4.6. Hormone de croissance : hGH

L'hormone de croissance ou hGH « human Growth Hormone », joue un rôle essentiel dans la croissance et participe aux régulations métaboliques.

A/-Structure

L'hormone de croissance humaine est une hormone polypeptidique (protéine non glycosylée), constituée de 191 acides aminés, de masse moléculaire 22 kDa et comportant deux ponts disulfures. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur ou pré-hormone dont le clivage protéolytique donne naissance à l'hormone active. Lors de l'excrétion, le peptide signal qui est une séquence de 15 à 30 acides aminés, est également clivé (Bertherat, 1996).

hGH est un polypeptide dont le gène hGH-N (normal) est situé sur le chromosome 17, de même que le gène hGH-V (variant) exprimé dans le placenta.

B/-Biosynthèse

L'hGH est synthétisée par les cellules somatotropes de l'antéhypophyse. Sa sécrétion est sous le contrôle combiné de mécanismes neurorégulateurs de stimuli physiologiques où l'hypothalamus joue un rôle central.

La sécrétion de GH par les cellules somatotropes est fonction du taux d'AMP cyclique intracellulaire. Celui-ci est dépendant de l'action antagoniste de deux peptides hypothalamiques dont l'un est stimulateur (GH-RH ou *GH releasing hormone*) et l'autre inhibiteur (SRIH ou *Somatotropin Release Inhibiting Hormone* ou somatostatine). Ces deux peptides sont sécrétés dans le système porte hypophysaire sous le contrôle de mécanismes complexes et multiples (**Figure 31**). L'hGH ainsi sécrétée induit la synthèse hépatique d'IGF-I. La régularisation de la sécrétion de hGH s'effectue essentiellement par rétrocontrôle négatif :

-direct : l'hGH inhibe sa propre sécrétion par action au niveau hypophysaire et la sécrétion de GH-RH au niveau hypothalamique ;

-indirect : l'IGF-I inhibe la sécrétion de GH-RH et stimule la sécrétion de SRIH.

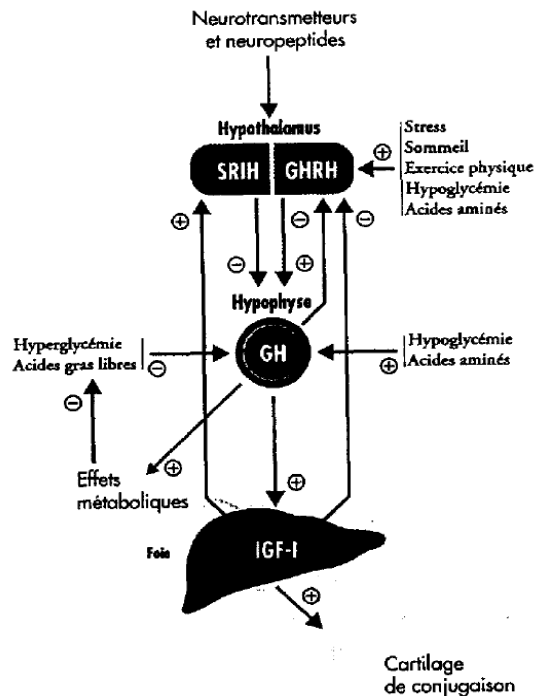


Figure 31: Physiologie de sécrétion de hGH (Gaillard, 2000).

La sécrétion de hGH s'effectue de manière pulsatile, avec des pics diurnes dont certains sont liés aux repas, à l'effort musculaire et au stress (Lahlou and Roger, 1996). L'hGH circule dans le plasma sous forme libre ou liée à des protéines à haute ou à basse affinité. Parmi elles, l'alpha 2 macroglobuline et surtout le GHBP (growth hormone binding protein).

C/-Mode d'action

La plupart des effets de l'hGH sont indirects, sous la responsabilité de IGF-I.

- Le premier temps de l'activité de L'hGH est la liaison de celle-ci aux récepteurs membranaires. Ces récepteurs sont situés dans les cellules cibles, mais leur faible nombre rend difficile leur individualisation. Leur répartition tissulaire diffuse peut expliquer la diversité des propriétés biologiques et métaboliques de cette hormone (Postel-Vinay, 1996). La liaison de l'hormone de croissance aux récepteurs aboutit à la formation d'un complexe (GH-GHBP) composé d'une molécule d'hormone et de deux molécules de récepteur.
- Le deuxième temps est constitué par la transduction.

D/-Effets biologiques

L'hGH circule dans le plasma sous différentes formes. L'essentiel de son activité biologique est sous la responsabilité de la forme 22 kDa (191 acides aminés). La forme 20 kDa,

dépourvue des acides aminés manquants, est dotée d'une forte activité hyperglycémiant mais est dénuée d'effet sur la croissance (Lahlou and Roger, 1996).

D1/-Effets tissulaires

Les effets tissulaires portent principalement sur la croissance. L'hGH stimule la croissance des os longs grâce à son activité sur les chondrocytes du cartilage de croissance (Lebouc, 1996). Cette activité nécessite une potentialisation par les hormones thyroïdiennes et peut être inhibée par des taux anormalement élevés de glucocorticoïdes.

L'induction de la croissance osseuse par les stéroïdes sexuels se fait en grande partie par la stimulation de l'axe GH/IGF-I. Sur le muscle, l'hGH produit une hypertrophie et une hyperplasie tissulaires. Sur le tissu hématopoïétique, l'hGH entraîne *in vitro* une stimulation de l'érythropoïèse.

D2/-Effets Métaboliques

hGH stimule la synthèse protidique et la rétention azotée. Elle possède des propriétés hyper-glycémiantes. En effet, l'hGH stimule la néoglucogenèse et la glycogénolyse hépatique. Ceci explique les diabètes des acromégales et les hypoglycémies des enfants ayant un déficit en hGH.

Sur le plan lipidique, L'hGH mobilise les lipides de stockage et augmente les taux d'acide gras libres plasmatiques. L'hGH provoque également une rétention de sodium, de potassium et de phosphore (Gaillard, 2000).

Le mode d'action intracellulaire de l'hormone de croissance est bien connu. Il exploite une double voie :

- A partir de la reconnaissance du récepteur sur la membrane des cellules cibles. Une voie oncogénique tyrosinekinase qui par une cascade de phosphorylation surexprime des oncogènes impliqués dans l'activation du cycle cellulaire et de la prolifération.
- La voie de la Protéine Kinase C (PKC) *via* le diacylglycérol (DAG). Cette deuxième voie, correspondant à la voie des phosphoinositides, contrôle plus spécifiquement le métabolisme intracellulaire en activant, par exemple la captation des acides aminés et la synthèse protéique, en stimulant la lipolyse (Gaillard, 2000).

En fait les deux voies (Tyr-K et phosphoinositides) sont parfaitement coopératives : la première induisant la prolifération et la croissance tissulaire, l'autre stimulant l'anabolisme en augmentant le "fuel" énergétique disponible pour le tissu en croissance.

D3/-Effets de hGH sur les organes génitaux

Chez le mâle cette hormone a des actions extra-gonadiques parmi lesquelles on peut citer l'accroissement et le maintien de la taille du pénis, la différenciation des canaux spermatiques chez l'adolescent et la stimulation de la synthèse d'enzymes dans certaines glandes annexes (vésicules séminales et la prostate). Cette hormone a aussi des effets sur les fonctions gonadiques parmi lesquelles nous retiendrons la spermatogenèse, la stimulation de la synthèse des androgènes, l'accroissement de la mobilité des spermatozoïdes.

Cette hormone exerce des effets gonadiques chez la femelle parmi lesquels on trouve la stimulation de la synthèse d'hormones stéroïdiennes, l'induction de l'ovulation, le recrutement et la croissance folliculaire, la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte. Cette hormone exerce aussi des effets extragonadiques sur l'activité sécrétoire des cellules épithéliales du tractus génital féminin, sur la croissance placentaire et sur divers aspects de la lactation.

D4/-Hormone de croissance et hormone lactogène placentaire

La croissance postnatale des mammifères est essentiellement sous la dépendance hGH et des hormones thyroïdiennes. Ces hormones influencent peu ou pas la croissance foetale.

En fait, au cours de la vie foetale, c'est l'hormone placentaire lactogène (hPL) ou hormone chorionique somatomammotrope (HCS) qui joue un rôle essentiel dans la croissance foetale. Chez l'homme, la structure primaire de la hPL est très semblable à celle de la hGH (96 % d'homologie) et à un degré moindre de celle de la prolactine. Elles sont aussi très proches sur le plan fonctionnel puisque la PL a des effets lactogènes *via* les récepteurs de la prolactine et des effets sur la croissance *via* les récepteurs de la GH.

Chez la femme, le placenta exprime aussi un gène codant pour une hormone de croissance spécifique, la hPGH (ou *human Placental Growth Hormone*). Cette hormone pourrait être le principal stimulant de l'anabolisme maternel.

Présente à des taux faibles dans le sang fœtal (**Figure 32**), la PL agit surtout en favorisant l'adaptation du métabolisme maternel et chez la femme, la hPL possède une activité lipolytique directe de type "GH" (Murphy et coll., 2006). Ainsi, lors d'un jeûne, la hPL favorise l'utilisation par la mère des acides gras comme source d'énergie, ce qui permet d'économiser le

glucose que le fœtus consomme de manière exclusive. Inversement, si les apports alimentaires sont excessifs, la hPL stimule la production d'insuline et augmente la sensibilité du tissu adipeux et du foie à cette hormone hypoglycémisante, favorisant ainsi la formation de réserves énergétiques (utilisables ultérieurement).

Outre le fait qu'elle est un intermédiaire maternel de la PL, l'insuline peut être considérée comme une hormone de croissance fœtale à part entière. Qu'elle soit produite par le pancréas fœtal sous l'effet d'une glycémie élevée ou synthétisée par les cellules embryonnaires. En fait, l'insuline est à la fois anabolisante, mitogénique et morphogénétique *via* ses propres récepteurs, ou ceux des IGF.

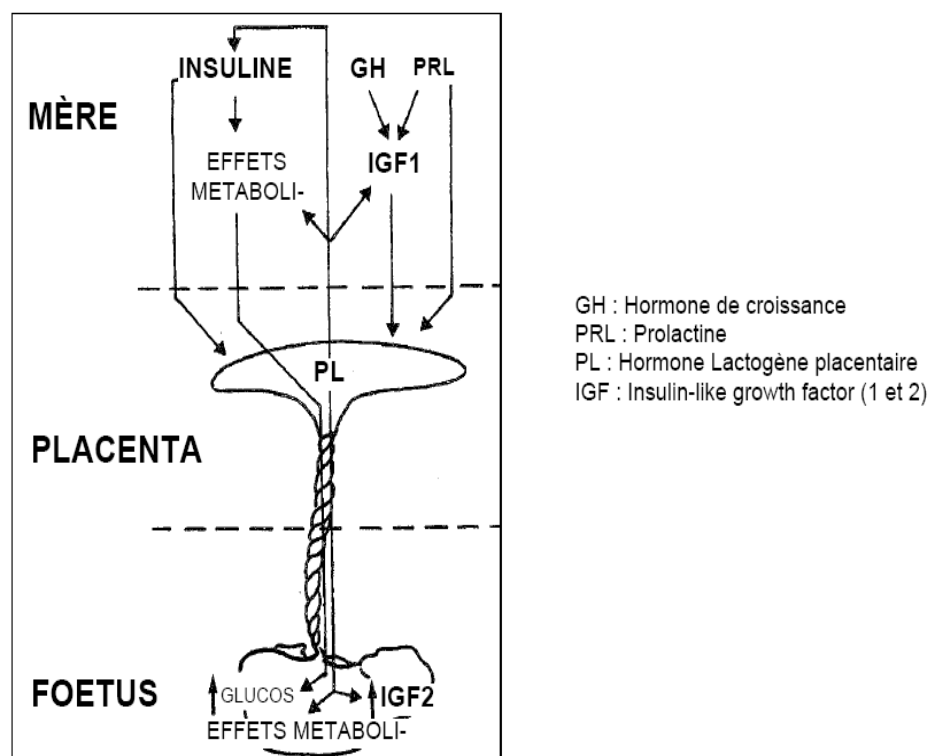


Figure 32: Contrôle hormonal du développement : interactions fœto-maternelles
(embryologie.ch, 2009).

4. 2. Diabète gestationnel, macrosomie et facteurs de croissances

Des études récentes ont montré que, autre que l'insuline, il existe une variété de facteurs de croissance qui jouent un rôle important dans la croissance fœtale (Zollers et coll., 2001).

En effet, plusieurs études ont montré l'augmentation au cours de la grossesse des taux sériques d'IGF-I, dans les deux compartiments maternel et fœtal. De plus, il existe une corrélation positive entre l'augmentation des concentrations d'IGF-I et le poids fœtale à la naissance (Lauszus, Klebe, and Flyvbjerg, 2001; Roth et coll., 1996; Zollers et coll., 2001).

Ceci montre bien l'implication directe de ces facteurs dans la croissance fœtale. Dans le cas où cette grossesse est complexée par un Diabète Gestationnel Mellitus (DGM), on remarque une augmentation des taux sériques d'IGF-I maternel et fœtal (Roth et coll., 1996; Yan-Jun et coll., 1996a).

Roth et coll. (Roth et coll., 1996) ont démontré que le DGM n'avait aucune influence sur l'expression de l'ARNm d'IGF-I placentaire. En plus, du fait que l'IGF-I ne traverse pas la barrière placentaire (Davenport et coll., 1990), donc il est improbable que l'augmentation d'IGF-I au niveau fœtal ne puisse être due qu'à l'élévation du taux d'IGF-I maternel. Néanmoins, cette élévation des taux d'IGF-I fœtal, peut être impliquée dans le gain de poids des bébés macrosomiques et ceci à cause de la similarité structurale qu'il présente avec l'insuline. Induisant ainsi une croissance des cellules somatiques et une prolifération cellulaire.

D'un autre côté IGF-I influence le transport du glucose et des acides aminés à travers le placenta. En effet, tout en ne traversant pas la barrière placentaire, IGFs et l'insuline maternelle, modulent le flux des nutriments vers le fœtus. La croissance du fœtus dépend donc de la qualité de l'adaptation du métabolisme maternel à la grossesse, sous l'influence des facteurs de croissance placentaires sécrétés dans le compartiment maternel. Par ailleurs, (Bhaumick, Danilkewich, and Bala, 1988) ont démontré qu'il y a une augmentation du nombre des récepteurs IGF-IR placentaires au cours d'un DGM. Cette augmentation va faciliter le mécanisme d'action des IGF-I chez les bébés macrosomiques.

Chez le fœtus, malgré des concentrations sériques fœtales notables et la présence de récepteurs tissulaires, l'hormone de croissance hypophysaire (hGH) ne joue pas un rôle important dans la croissance fœtale. Ainsi, l'anencéphalie n'est généralement pas associée à un retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Meda et coll., 1995). À l'inverse, l'insuline et les facteurs tissulaires de croissance (IGF-I et IGF-II) sont des acteurs établis de la croissance fœtale (Lindsay et coll., 2007). D'un autre côté, cette croissance fœtale est également limitée par l'environnement utérin et nutritionnel maternel. On observe ainsi une hypotrophie fœtale dans les grossesses multiples et dans le cas d'une malnutrition.

La biodisponibilité d'IGF-1 est régulée par IGF-BP3. En effet, complexé avec IGF-1, IGF-BP3 va jouer le rôle de réservoir à cette hormone au niveau du sang circulant (Lee, Conover, and Powell, 1993). Il a été démontré qu'au cours d'un DGM il y a une augmentation du taux d'IGF-BP3 au niveau sang fœtal (Yan-Jun et coll., 1996b) accompagné d'une baisse d'ARNm d'IGF-BP3 placentaire. D'où il est possible que l'augmentation de l'insuline (Grissa et coll., 2007; Westgate et coll., 2006) et de l'IGF-I, chez les mères et les nouveaux-nés, soient

responsables de l'élévation de la synthèse d'IGF-BP3 placentaire. En effet, il a été démontré que l'insuline est responsable de la régulation du taux d'IGF-BP3 chez les DGM (Bereket et coll., 1995). De plus, un traitement *in vitro* avec l'insuline et de l'IGF-I stimule la sécrétion d'IGF-BP3.

Le placenta est aujourd'hui identifié comme un organe endocrine non autonome influencé par des facteurs maternels et fœtaux, en particulier : l'hormone de croissance, IGFs et l'insuline (Garnica and Chan, 1996), justifiant la notion d'unité materno-placento-fœtale. Le placenta sécrète l'hormone de croissance placentaire (ou GH variant GH-V), qui elle-même responsable de l'élévation des taux d'IGF-I maternels pendant la grossesse.

En fait, il a été démontré que le taux de GH diminue progressivement au cours d'une grossesse normale (Mirlesse et coll., 1993), ou atteinte d'un DGM (Lee et coll., 1999). Ceci peut s'expliquer du fait que l'insulino-résistance, due au DGM, va induire une élévation des taux plasmatiques en insuline ce qui produit une diminution des taux de GH (Lee et coll., 1999).

(Lacroix et coll., 1999) ont démontré, que chez les moutons, l'exposition du placenta à un taux élevé d'IGF-I peut induire une inhibition du taux de GH pituitaire. D'un autre côté, (Misra et coll., 2008) ont montré que la baisse du taux de GH pituitaire chez les femmes obèses est associée à une adiposité viscérale, à une insulino-résistance et à un taux lipidique élevé. Cette observation suggère que la diminution du taux de GH, produite par l'hyper-insulinémie, d'une part, et le taux élevé d'IGF-I, d'autre part, pourrait être expliquée par le gain du poids.

Il a aussi été montré que l'EGF possède des propriétés mimétiques à celles de l'insuline, comme la prolifération, la différenciation cellulaire et la régulation de la croissance foetalo-placentaire (Gogg and Smith, 2002; Lacroix et coll., 1999). (Loukovaara et coll., 2004) ont montré que la DGM était accompagnée par une augmentation des taux fœtale en EGF. En effet, EGF a la capacité de promouvoir le transport aminoacide dans le placenta du rat, et par la suite influencer la croissance fœtale (Masuyama, Hiramatsu, and Kudo, 1996).

FGF-2 est aussi un facteur de croissance ressemblant à l'insuline, incapable à traverser la barrière placentaire (Hofmann and Abramowicz, 1990). De nos jours on n'est pas capable de bien expliquer comment le DGM augmente la concentration fœtale en FGF-2 sérique. Cependant, M. Loukovaara et coll (Loukovaara et coll., 2004) ont essayé d'expliquer cette augmentation par le fait qu'elle représente une réponse métabolique du compartiment foetalo-placentaire à l'hyperglycémie induite par le diabète. Hill et coll (Hill et coll., 1995) ont montré

que le placenta représente le site principal de synthèse de FGF-2 et que cette dernière (Amaya, Musci, and Kirschner, 1991) est très exprimée au niveau du tissu embryonnaire où elle va exercer ses pouvoirs mitogène et morphogénique. Une autre étude (Hill and Milner, 1985) a montré que le taux élevé d'FGF-2 est responsable de l'augmentation de l'incidence de la macrosomie.

Les facteurs de croissance dérivée des plaquettes (PDGF) et leurs récepteurs (PDGFR) sont des importants régulateurs des interactions tissulaires, des migrations cellulaires, de la prolifération et de la formation de la matrice extracellulaire durant le développement des mamelles embryonnaires (Hoch and Soriano, 2003). PDGF-B et PDGF-D se lient principalement à PDGFR- β qui est impliqué dans l'organogénèse, alors que PDGF-A se lie à PDGFR- α qui est responsable de l'embryogénèse (Hoch and Soriano, 2003). PDGF-C se lie aux deux types de récepteurs PDGFR- α et PDGFR- β et joue un rôle limité dans le développement fœtal (Hoch and Soriano, 2003). PDGF-B et PDGFR- β sont essentiels pour le développement fœtal normal, du point de vue structural et fonctionnel des vaisseaux et des capillaires (Nystrom et coll., 2006). En effet la production en PDGF-B du myomètre, augmente pendant la grossesse, cette augmentation est associée à l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules musculaires de l'utérus, caractéristique d'un utérus gestationnel.

(Heinig et coll., 2000) ont remarqué une élévation considérable des taux d'ARNm de PDGFR chez les mères présentant un DGM en les comparant à des mères normales. Dans la mesure du possible, et à chaque fois que les inducteurs physiologiques du taux de PDGFR- β sont sollicités, c'est l'insuline qui en est responsable. En effet, il a été démontré que l'insuline accroît l'effet mitogène de PDGFR- β sur des cellules des muscles lisses en activant la cascade signalétique cellulaire, particulièrement avec la phosphatidylinositol-3-kinase du PDGFR- β . De même, (Zhuang et coll., 2008) ont récemment démontré que l'insuline accroît la phosphorylation du PDGFR- β et amplifie la capacité mitogène de PDGFR-B.

En présentant un taux élevé et par l'intermédiaire de PDGFR- β , PDGFR-B peut aussi participer dans l'angéogénèse placentaire, au cours d'un DGM, en formant une boucle de stimulation dans les cellules des capillaires endothéliales afin de promouvoir la prolifération cellulaire attendue (Holmgren et coll., 1991).

L'insuline et les facteurs de croissance apparaissent comme des médiateurs clefs de l'apport énergétique au fœtus, lui-même sous la dépendance de la coopération materno-placentaire. Une bonne compréhension de la croissance fœtale et de sa pathologie est donc indissociable d'une étude approfondie de la physiologie placentaire.

DEUXIEME PARTIE :

Apports personnels

*Liste des Publications
et Communications*

Publications

PUBLICATIONS

★ **O. Grissa**, A. Yessoufou, I. Mrisak, A. Hichami, D. Amoussou-Guenou, A. Grissa, F. Djrolo, K. Moutairou, A. Miled, H. Khairi, M. Zaouali, A. Zbidi, Z. Tabka, and N. A. Khan, **Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus: possible interactions with macrosomia.** *BioMed Central Preg Childbirth*.

★ **O. Grissa**, J.-M. Ategbo, A. Yessoufou, Z. Tabka, A. Miled, M. Jerbi, K. L. Dramane, K. Moutairou, J. Prost, A. HICHAMI, and N. A. Khan: **Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia.** *Transl Res*, Sep 2007, 150(3):164-171.

★ J.-M. Ategbo, **O. Grissa**, A. Yessoufou, A. Hichami, K. L. Dramane, K. Moutairou, A. Miled, A. Grissa, M. Jerbi, Z. Tabka, and N. A. Khan: **Modulation of Adipokines and Cytokines in Gestational Diabetes and Macrosomia.** *J Clin Endocrinol Metab*, October 2006, 91(10):4137–4143.

COMMUNICATIONS

★ **O. Grissa**, J.-M. Ategbo, I. Mrizeg, A. Grissa, A. Yessoufou, A. Hichami, A. Miled, M.Zaouali, Z. Tabka, N.A. Khan, **The expression of mRNA growth factor and their receptor in placenta of gestational diabetes mellitus mothers.** Deuxième congrès international de nutrition de Tunisie, Octobre 2008.

★ **O. Grissa**, J.-M. Ategbo, I. Mrizeg, A. Grissa, A. Yessoufou, A. Hichami, A. Miled, M.Zaouali, Z. Tabka, N.A. Khan, **Activité de la superoxyde dismutase et des taux de vitamine A, E et C chez les nouveaux nés macrosomique.** 5th International meeting: Advances in antioxidants (Trace elements and polyphenols) molecular mechanisms, nutritional and clinical aspects, October 2008.

★ **O. Grissa**, J.-M. Ategbo, A. Miled, M. Jerbi, N.A. Khan, Z. Tabka : **Growth factors are altered in human gestational diabetes and their macrosomic offspring.** Second Congress Internationale de Chronobiologie et de Chronomedecine appliquée, Mars 2007.

★ **O. Grissa**, J-M. ATEBGO, A. KASDALLAH-GRISSA, M. JERBI, A.H. MILED, M. BIBI, N. KHAN et Z. TABKA. **Antioxidant status in macrosomic babies of woman with gestational diabetes.** Congrès P2T de la Société de Physiologie, Montpellier 10-12 Avril 2006.

★ JM. Ategbo, **O. Grissa**, A. Yessoufou1, Z. Tabka, A. Miled, K. Moutairou, M. Jerbi6, K.L. Dramane, A. Hichami1, N.A. Khan. **Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and their macrosomic offspring.** Congrès P2T de la Société de Physiologie, Montpellier 10-12 Avril 2006.

★ JM. Ategbo, Yessoufou. A, **O. Grissa**, Z. Tabka, A. Miled, K. Moutairou, M. Jerbi, KL. Dramane, A.Hichami, N.A.Khan : **Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia.** 12^{ème} journée du savoir, 11 juin 2006, Dijon.

★ JM. Ategbo, **O. Grissa**, A. Yessoufou, A. Hichami, KL. Dramane, K. Moutairou, A. Miled, M. Jerbi, Z. Tabka and NA. Khan : **Modulation des adipokines et différenciation des cellules T au cours du diabète gestationnel et la macrosomie,** 12^{ème} Forum des jeunes chercheurs, 8-9 Juin 2006, Besançon.

★ **O. Grissa**, J-M. ATEBGO, A. KASDALLAH-GRISSA, M. JERBI, A.H. MILED, M. BIBI, N. KHAN et Z. TABKA **Activité du superoxyde dismutase et taux des vitamines A, E et C chez les nouveau-nés macrosomiques.** Association Tunisiennes des Sciences Biologiques. 17^{èmes} journées Biologiques, p. 86, Hammamet 20-23 Mars 2006.

★ **O. Grissa**, A. Kasdallah-Grissa, M. Jerbi, A.H. Miled, M. Bibi, Z. Tabka : **Superoxide dismutase activity in macrosomic newborns.** 72^{ème} congrès de la société de physiologie, Rennes 27-29 juin 2005.

*Modulation of adipokines and cytokines
in gestational diabetes and macrosomia*

Publication n°1

Publication n°1

Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia

JM. Atègbo, **O. Grissa**, A. Yessoufou, A. Hichami, KL. Dramane, K. Moutairou, A. Miled, A. Grissa, M. Gerbi, Z. Tabka and NA. Khan

J Clin Endocrinol Metab 2006; **91**: 4137-4143.

Objectif de l'étude

L'implication des adipokines et des cytokines Th1 et Th2 au cours du diabète gestationnel et la macrosomie est peu connue. Le but de cette étude est d'évaluer le profil de ces hormones et de ces cytokines chez des nouveau-nés macrosomiques issus de mères diabétiques.

Modulation of Adipokines and Cytokines in Gestational Diabetes and Macrosomia

J.-M. Atègbo, O. Grissa, A. Yessoufou, A. Hichami, K. L. Dramane, K. Moutairou, A. Miled, A. Grissa, M. Jerbi, Z. Tabka, and N. A. Khan

Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieure Lipids and Nutrition (J.-M.A., A.Y., A.H., N.A.K.), Faculty of Life Sciences, University of Burgundy, Dijon 21000, France; Laboratories of Animal Physiology (J.-M.A., K.L.D.) and Cell Biology and Physiology (A.Y., K.M.), Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin; and Departments of Physiology and Functional Exploration (O.G., A.G., Z.T.), Biochemistry (A.M.), and Gynaecology (M.J.), University Hospital Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisia

Context/Objective: Not much is known about the implication of adipokines and different cytokines in gestational diabetes mellitus (GDM) and macrosomia. The purpose of this study was to assess the profile of these hormones and cytokines in macrosomic babies, born to gestational diabetic women.

Design/Subjects: A total of 59 women (age, 19–42 yr) suffering from GDM with their macrosomic babies (4.35 ± 0.06 kg) and 60 healthy age-matched pregnant women and their newborns (3.22 ± 0.08 kg) were selected.

Methods: Serum adipokines (adiponectin and leptin) were quantified using an obesity-related multiple ELISA microarray kit. The concentrations of serum cytokines were determined by ELISA.

Results: Serum adiponectin levels were decreased, whereas the concentrations of leptin, inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , were significantly increased in gestational diabetic mothers

compared with control women. The levels of these adipocytokines were diminished in macrosomic babies in comparison with their age-matched control newborns. Serum concentrations of T helper type 1 (Th1) cytokines (IL-2 and interferon- γ) were decreased, whereas IL-10 levels were significantly enhanced in gestational diabetic mothers compared with control women. Macrosomic children exhibited high levels of Th1 cytokines and low levels of IL-10 compared with control infants. Serum IL-4 levels were not altered between gestational diabetic mothers and control mothers or the macrosomic babies and newborn control babies.

Conclusions: GDM is linked to the down-regulation of adiponectin along with Th1 cytokines and up-regulation of leptin and inflammatory cytokines. Macrosomia was associated with the up-regulation of Th1 cytokines and the down-regulation of the obesity-related agents (IL-6 and TNF- α , leptin, and adiponectin). (*J Clin Endocrinol Metab* 91: 4137–4143, 2006)

GESTATIONAL DIABETES mellitus (GDM), defined as a carbohydrate intolerance of varying severity, is the most frequent metabolic disorder of pregnancy, affecting 1–10% of all pregnancies (1). Although most of the women with GDM return to normal glucose tolerance after delivery, they have an increased risk of developing diabetes, mainly type 2 diabetes mellitus (DM), later on, with an incidence ranging from 6–62%, depending on the population examined and the length of the follow-up considered (2). The offspring of women with GDM are prone to adverse side effects such as macrosomia, which is strongly associated with fetal death, prematurity, birth trauma, and respiratory distress syndrome; and equally important, these offspring have a high risk of developing obesity, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes in adulthood (3).

Cytokines, through their ability to interfere with insulin signaling, have been implicated in insulin resistance in type 2 DM (4). Adiponectin, a physiologically active polypeptide hormone derived from adipose tissue, exhibits insulin-sen-

sitizing, antiatherogenic, and antiinflammatory properties (5). Although the effect of adiponectin in insulin sensitivity has been studied, limited data are available on the association between adiponectin and pregnancy-induced insulin resistance (6). Moreover, hypoadiponectinemia is associated with the pathogenesis of GDM and macrosomia (6).

Because adipocytokines may play an important role in the early defects of type 2 diabetes (4), women with GDM represent an ideal population model to study these interrelationships. A recent study of 15 subjects has suggested a role for TNF- α (7) in this pregnancy-induced insulin resistance. Furthermore, another study has found an association between TNF- α and fasting C-peptide levels (8). Dandona *et al.* (9) have proposed that TNF- α may provide a mechanism for mediating insulin resistance. To date, few studies have reported that TNF- α might be elevated in GDM (8, 10). Leptin, another adipocytokine, is also produced by the placenta and involved in weight regulation and lipid metabolism. Contradictory results have been reported on its secretion in GDM. Indeed, Kautzky-Willer *et al.* (11) have observed elevated leptin levels in gestational diabetic women, whereas Simmons and Breier (12) did not find any change. However, Festa *et al.* (13) have found that leptin level was reduced in GDM.

IL-6 can also be involved in the pathogenesis of insulin resistance, type 2 DM, abnormal adiposity, or lipid disorders

First Published Online July 18, 2006

Abbreviations: BMI, Body mass index; DM, diabetes mellitus; GDM, gestational DM; HbA1c, glycosylated hemoglobin; IFN, interferon; Th, T helper.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

(14). The observation that 10–35% of the body's basal circulating IL-6 is derived from adipose tissue has stimulated interest in this cytokine as a possible mediator of metabolic processes. Furthermore, the correlation between circulating IL-6 and adiposity has been shown (14). Moreover, positive correlation has been found between insulin resistance and circulating IL-6 levels (15), which were elevated in the plasma of patients with type 2 DM (16, 17).

Through different experimental models of diabetes, it has been well established that the secretion of cytokines plays an important role in the regulation of tolerance of islet antigens (18). The production of these cytokines during the islet inflammatory response may, in part, explain the ability of CD4⁺ Th (T helper) cells alone to cause β -cell destruction (18). On the basis of production of cytokines, Th cells can be classified into two principal populations, Th1 and Th2. Th1 cells support cell-mediated immunity and as a consequence promote inflammation, cytotoxicity, and delayed-type hypersensitivity; whereas Th2 cells support humoral immunity and down-regulate the inflammatory actions of Th1 cells (19). Th1 cells secrete IL-2, IFN- γ , and TNF- β ; whereas Th2 cells secrete IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-13. Th1 cytokines, mainly IFN- γ , play a pathogenic role; whereas Th2 cytokines, mainly IL-4 and IL-10, assure regulatory function and thus mediate protection during diabetes (20, 17). Th2 cytokines, especially IL-4, are also involved in allergic responses (19).

Thus, the current study was undertaken to investigate the implication of adipocytokines (adiponectin and leptin) and proinflammatory mediators (TNF- α and IL-6) in gestational diabetic women and their macrosomic newborns. Because T cells play an important role in the onset of gestational diabetes, we quantified the concentrations of principal T cell cytokines in both mothers with GDM and macrosomic infants.

Subjects and Methods

Subjects

A total of 59 gestational diabetic mothers with their macrosomic babies were recruited in the Gynecology Department, Hôpital Universitaire Farhat Hached, Sousse, Tunisia. In GDM, the pathology appeared in the second or third trimester of pregnancy. These women were be-

tween 19 and 42 yr old, and 75% of the diabetic mothers had an episiotomy during delivery (Table 1). They were hyperglycemic and hyperinsulinemic. As control subjects, 60 healthy age-matched pregnant women and their newborn babies were selected.

Newborn babies were immediately weighed after delivery. Babies from diabetic mothers whose birth weight was 2 sd greater than the mean birth weight of the control infants were considered as macrosomic infants and included in the study. The mean birth weight of macrosomic babies in this study was 4.35 ± 0.06 kg, whereas that of control infants was 3.22 ± 0.08 kg with a respective body mass index (BMI) of 33.84 ± 0.65 and 13.38 ± 0.22 kg/m² (Table 1).

Selected control women had no significant history of illness, no pregnancy-related complications, and no risk factor for gestational diabetes. They had normal glucose tolerance tests during the first and third trimesters of pregnancy. An attempt was made to match these women to diabetic subjects, at least regarding maternal age, BMI as determined by the weight and height of patients, parity, gestational age, and mode of delivery. Both diabetic and control mothers were offered regular examinations of their offspring. The characteristics of mothers and newborns are shown in Table 1.

The protocol was approved by the Sousse Farhat Hached Hospital Committee for Research on Human Subjects (Tunisia). Informed written consent was obtained from all of the subjects.

Blood samples

From each patient or control subject, fasting venous blood samples were collected at delivery in tubes containing or not EDTA to obtain plasma and serum, respectively. The cord blood samples of the babies were collected at delivery. Serum or plasma was obtained by centrifugation ($1000 \times g$ for 20 min). Plasma was immediately used for glucose and glycosylated hemoglobin (HbA1c) determinations. Serum was aliquoted and frozen at -80 C for additional determinations of insulin, lipids and adipocytokines, and T cell cytokine concentrations.

Determination of plasma glucose and HbA1c and serum insulin and lipid concentrations

Serum triglycerides, total cholesterol, and free cholesterol concentrations were determined by using enzymatic methods, according to the instructions furnished with the kit (Boehringer, Mannheim, Germany). Plasma fasting glucose was determined by the glucose oxidase method using a glucose analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Plasma HbA1c levels were determined by isolab column chromatography (21). Serum concentrations of insulin were determined by using the Insulin IRMA kit (Ref. IM3210; Immunotech, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) with a detection limit of $0.5 \mu\text{IU/ml}$. The interassay coefficients of variability were 3.3 and 4%, respectively, for the concentrations 13 and 54 IU/ml.

TABLE 1. Characteristics of mothers and their offspring

	Mothers		Newborns	
	Control	Diabetic	Control	Macrosomic
N	60	59	60	59
Female/male ratio	60/0	59/0	31/29	36/33
Age	19–42 yr	22–42 yr	<1 month	<1 month
Body weight (kg)			3.22 ± 0.08	4.35 ± 0.06^a
BMI (kg/m ²)			13.38 ± 0.22	33.84 ± 0.65^a
HbA1c (%)	4.3 ± 0.20	6.6 ± 0.30^a		
Cranial perimeter (cm)			34.17 ± 0.21	35.87 ± 0.29
Macrosomia history (%)	0	43		
Episiotomy (%)	35	75		
Fasting glucose (mmol/liter)	4.86 ± 0.71	6.87 ± 0.63^a	5.51 ± 0.38	4.99 ± 0.38
Insulinemia ($\mu\text{IU/ml}$)	5.98 ± 1.13	11.41 ± 4.71^a	5.77 ± 0.88	7.78 ± 3.15^a
Triglycerides (mM)	3.07 ± 0.22	3.07 ± 0.25	1.02 ± 0.04	1.30 ± 0.04^a
Total cholesterol (mM)	6.33 ± 0.32	5.37 ± 0.65	0.83 ± 0.21	1.34 ± 0.17^a
Free cholesterol (mM)	12.11 ± 0.34	9.30 ± 0.93^a	6.66 ± 0.30	7.55 ± 0.15^a

Values are means \pm SD. n = 60 control mothers/babies; n = 59 gestational diabetic mothers/macrosomic babies.

^a Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls: $P < 0.01$.

Determination of serum adipocytokines, IL-6, and TNF- α levels

The levels of serum adipocytokines, IL-6, and TNF- α were measured by using an obesity-related multiple ELISA array (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA), according to the manufacturer's instructions. The enzyme-substrate reaction was imaged by a CCD-based microarray scanner capable of quantitatively measuring chemiluminescence. The quantified intensity of the spots was directly proportional to the amount of human adipokines in the standard solution or samples.

Determination of serum cytokine levels

The determination of cytokine concentrations was performed on serum samples that were stored at -80°C . The repeated freeze-thaw cycles were avoided. The cytokines were quantified by ELISA, using eBioscience human Th1/Th2 ELISA Ready-Set-Go kit, according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Values are means \pm SD. Statistical analysis of data was carried out using STATISTICA (version 4.1; Stat-Soft, Paris, France). Data were evaluated by ANOVA. Duncan's multiple-range test was employed for the comparison between gestational diabetic patients or macrosomic newborns and their corresponding control subjects. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Blood HbA1c, insulin, and glucose levels

Plasma HbA1c levels were higher in women with GDM than the nondiabetic mothers (Table 1). Gestational diabetic women exhibited higher fasting glycemia and insulinemia compared with healthy pregnant mothers. The macrosomic babies, as well as their age-matched controls, were normoglycemic, but the former were hyperinsulinemic (Table 1).

Serum lipid levels

Triglyceride and total cholesterol did not differ between gestational diabetic and control mothers. Free cholesterol was lower in diabetic women than control mothers. Triglyceride, total cholesterol, and free cholesterol were significantly higher in macrosomic babies compared with control offspring (Table 1).

Serum adipocytokine levels

Serum adiponectin concentration was decreased, whereas leptin, IL-6, and TNF- α levels were significantly increased in gestational diabetic mothers compared with pregnant control women (Figs. 1 and 2). All of these adipocytokine levels were diminished in macrosomic babies in comparison with their age-matched control newborns. TNF- α , leptin, and IL-6 levels in GDM were positively correlated with insulin, fasting glucose concentrations, and lipid parameters. Adiponectin levels in GDM maternal circulation were negatively correlated with insulin and fasting glucose. TNF- α , leptin, adiponectin, and IL-6 levels in macrosomic infants were inversely correlated with insulin and BMI.

Serum T cell cytokine levels

Serum IL-2 and IFN- γ concentrations were diminished in women with GDM compared with control mothers (Fig. 3), whereas these cytokines were increased in their macrosomic

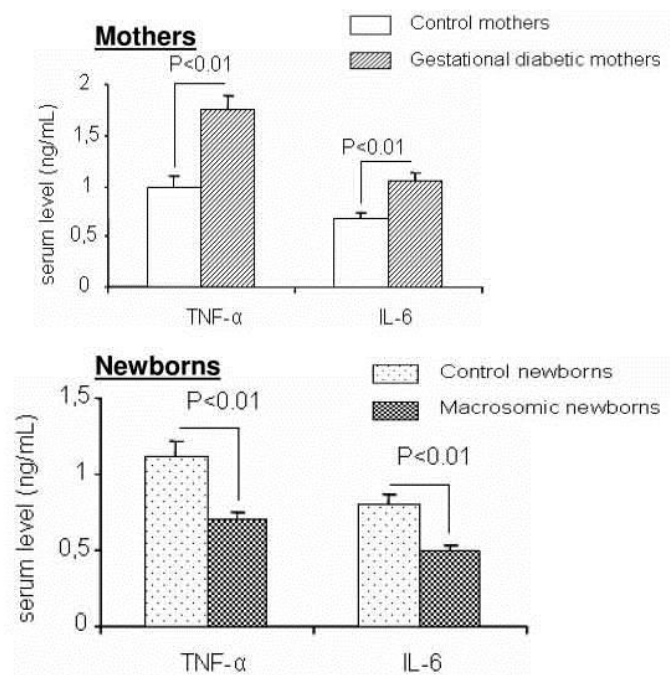


FIG. 1. Serum TNF- α and IL-6 concentrations in gestational diabetic and control women and their newborns. Serum TNF- α and IL-6 concentrations were determined as described in *Subjects and Methods*. Values are means \pm SD; $n = 60$ control mothers/babies; $n = 59$ gestational diabetic mothers/macrosomic babies.

babies (Fig. 4). No difference was observed in serum IL-4 concentrations between control and gestational diabetic mothers and between control and macrosomic newborns. IL-10 concentrations were up-regulated in gestational diabetic mothers (Fig. 3) but down-regulated in macrosomic offspring (Fig. 4). The Th1/Th2 ratio (as measured by IL-2/IL-4, IL-2/IL-10, IFN- γ /IL-4, and IFN- γ /IL-10) demonstrate down-regulation and up-regulation of the Th1 profile, respectively, in gestational diabetic mothers and macrosomic newborns (Table 2).

Discussion

In the present study, the diabetic pregnant women were hyperinsulinemic and hyperglycemic, reflecting a decrease in insulin sensitivity in these individuals, in accordance with several reports (22). Although these subjects with GDM were also normolipidemic, they exhibited high HbA1c levels, indicating a poorly controlled diabetic condition (23). However, their macrosomic infants were only hyperinsulinemic. Indeed, it has been shown that during GDM, the mother's glucose, after its passage via the fetoplacental barrier, induces the release of insulin from fetal pancreas and, thereby, produces fetal hyperinsulinemia (22).

Recent data have shown that the plasma concentration of inflammatory mediators, such as TNF- α and IL-6, is increased in the insulin-resistant states of obesity and type 2 diabetes (24). The observation that 10–35% of the body's basal circulating IL-6 is derived from adipose tissue has stimulated interest in this cytokine as a possible mediator of metabolic processes (14, 25). In the present study, we have

4140 J Clin Endocrinol Metab, October 2006, 91(10):4137–4143

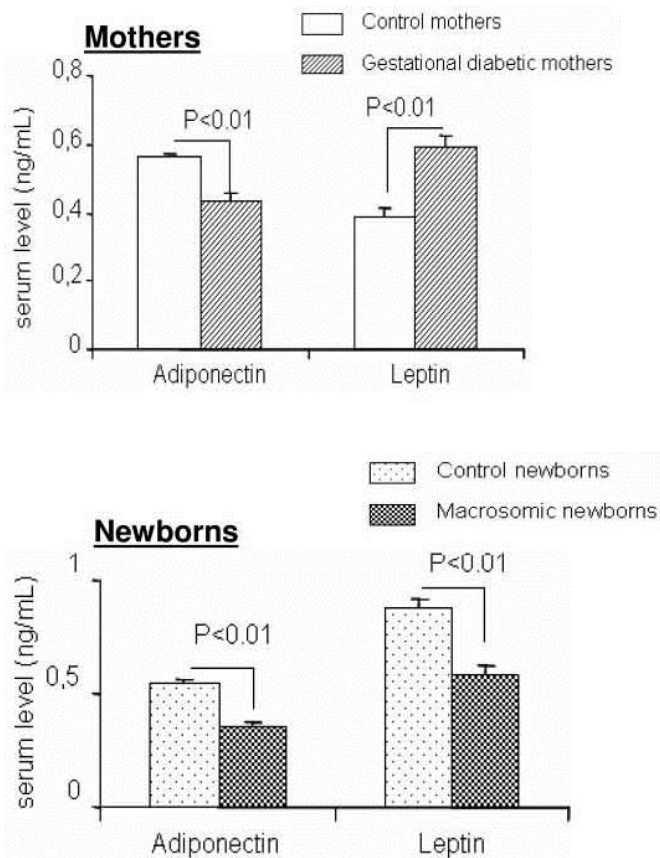
Atègbo *et al.* • Adipokines and Cytokines in GDM and Macrosomia

FIG. 2. Serum adiponectin and leptin concentrations in gestational diabetic and control women and their newborns. Serum adiponectin and leptin concentrations were determined as described in *Subjects and Methods*. Values are means \pm SD; n = 60 control mothers/babies; n = 59 gestational diabetic mothers/macrosomic babies.

noticed that the concentrations of TNF- α and IL-6 are increased in women with GDM. It has been suggested that the increases in TNF- α and IL-6 in diabetic conditions might be a result of oxidative stress and inflammatory changes caused by hyperglycemia (26). In fact, Mohanty *et al.* (27) have shown that the ingestion of glucose in normal subjects induces a fall in α -tocopherol concentrations and an increase in p47^{phox} expression in peripheral mononuclear cells and a peak of reactive oxygen species generation of more than 200% of the basal levels. Hence, increased concentrations of TNF- α and IL-6 might not only diminish insulin sensitivity by suppressing insulin signal transduction but also interfere with the antiinflammatory effect of insulin in these subjects (24). These inflammatory mediators may also interfere with adipokines (see below).

Adipokines, secreted by adipose tissue, are required for a number of physiological and metabolic processes (28). Despite the potential importance of these agents as putative mediators of metabolic disorders, little is known about their implications in GDM and macrosomia. In the present study, we have observed that the levels of adiponectin, an antiinflammatory agent (29), are decreased in women with GDM. Our results are in accordance with those obtained by Meller *et al.* (30), who have reported that adiponectin concentrations

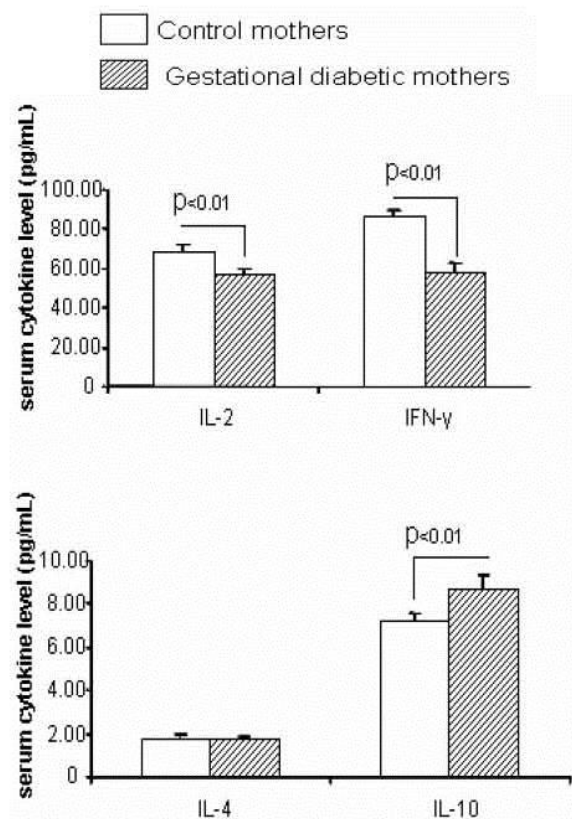


FIG. 3. Serum IL-2, IFN- γ , IL-4, and IL-10 concentrations in gestational diabetic and control women. Serum Th1 and Th2 cytokine concentrations were determined as described in *Subjects and Methods*. Values are means \pm SD; n = 60 control mothers; n = 59 gestational diabetic mothers.

are decreased in human pregnancies complicated with DM compared with nondiabetic pregnancies. Is there any physiological importance of concomitant high TNF- α levels and low adiponectin concentrations in women with GDM? Hence, we can state that these two agents might counteract with their mechanisms of actions. Indeed, it has been shown that adiponectin and TNF- α produce opposite effects on insulin signaling, with TNF- α inhibiting (31) and adiponectin increasing (32) tyrosine phosphorylation of the insulin receptor. Besides, it is also possible that TNF- α may be responsible for the lowered synthesis of adiponectin in GDM subjects because Ruan and Lodish (33) have suggested that the former inhibits the synthesis of the latter. According to Lihn *et al.* (34), both the mediators, TNF- α and IL-6, down-regulate adiponectin expression. Adiponectin has been shown to enhance insulin sensitivity, although its mechanism of action remains unclear (29). The low concentrations of adiponectin may also be responsible for the lack of diminution of hyperglycemia in GDM women. We would like to mention the study of Tsai *et al.* (35), who have demonstrated that decreased maternal adiponectin concentration and insulin sensitivity may increase risk of fetal overgrowth in women suffering from GDM. Finally, we can state that TNF- α and IL-6 may also be involved in the pathogenesis of insulin resistance, type 2 diabetes, abnormal adiposity, or lipid disorders.

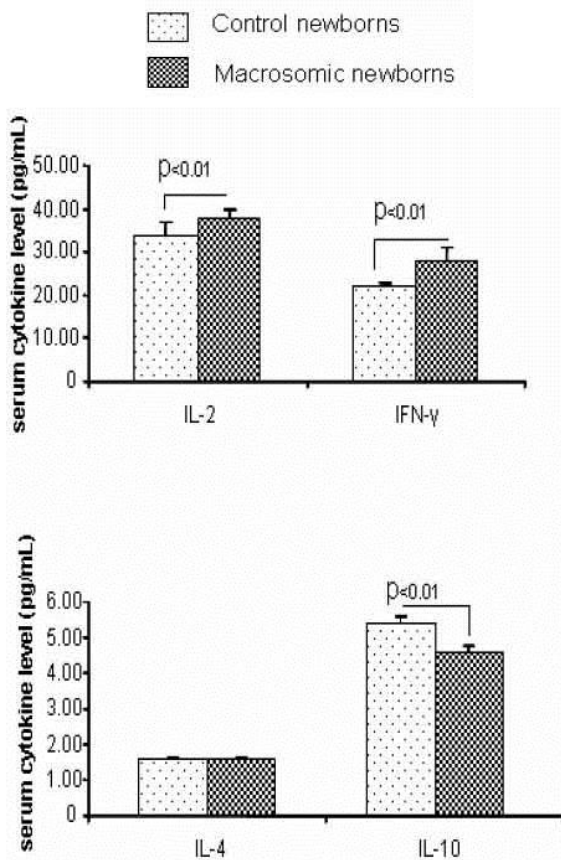


FIG. 4. Serum IL-2, IFN- γ , IL-4, and IL-10 cytokine concentrations in macrosomic and control newborns. Serum Th1 and Th2 cytokine concentrations were determined as described in *Subjects and Methods*. Values are means \pm SD; n = 60 control babies; n = 59 macrosomic babies.

Leptin is principally produced by adipocytes and secreted into the bloodstream (36). It is an appetite suppressant agent, and it exerts its effects by interacting with neuropeptide Y, MSH, and the melanocortin-4 receptor in the hypothalamus (37). In the present study, we have observed that the concentrations of leptin were higher in women with GDM than the control pregnant mothers. There is a controversy as far as the levels of leptin in GDM are concerned. Leptin levels have been reported either elevated (11) or unaltered (12) or reduced (13) in GDM pregnancy, albeit a recent study (38) has shown that maternal leptin concentrations are high in women with GDM. This discrepancy could be a result of the

TABLE 2. The ratios of serum Th1 and Th2 cytokine concentrations in GDM mothers and their newborns

	IL-2/IL-4	IL-2/IL-10	IFN- γ /IL-4	IFN- γ /IL-10
Control mothers	39.05	9.41	49.87	12.02
GDM mothers	31.61 ^a	6.54 ^a	31.76 ^a	6.57 ^a
Control newborns	20.93	6.22	13.67	4.06
Macrosomic newborns	23.56 ^a	8.18 ^a	17.34 ^a	6.02 ^a

Values are the ratios of serum Th1 and Th2 cytokine concentrations; n = 60 control mothers/babies; n = 59 GDM mothers/macrosomic babies.

^a Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls: $P < 0.01$.

differences in the time of the maternal blood collection (*i.e.* gestational age). However, elevated leptin concentrations during diabetic pregnancy may be a result of its secretion by the adipocytes in the presence of elevated estrogen (39) and placenta (40). In fact, leptin, acting as a signal for sufficient energy supply, is persistently increased in women with GDM after delivery and associated with hyperglycemia and insulin resistance (11). It is also possible that hyperleptinemia in GDM might have favored the development of macrosomia in the fetuses. Indeed, Yura *et al.* (41) have reported that mice born to dams that had abnormal placental leptin levels developed accelerated weight gain and adiposity. Previously, we have mentioned that hyperglycemia-induced oxidative stress may be responsible for the production of TNF- α and IL-6. Again, increased leptin levels observed in women with GDM might induce oxidative stress that may be subsequently involved in the release of inflammatory mediators (42).

It is important to notice that the concentrations of TNF- α , IL-6, adiponectin, and leptin are decreased in macrosomic infants compared with control babies. A plausible explanation for these changes is not available. However, we can cite the study of Weiss *et al.* (43), who have shown that circulating adiponectin levels are significantly lower in obese children than the nonobese infants. Low leptin levels in these macrosomic babies may contribute to weight gain because it has been shown that leptin-deficient rodents (37) and humans (44) develop marked obesity.

It has been well propounded that during normal pregnancy, Th1 cytokines are down-regulated, whereas cytokines belonging to Th2 cells are up-regulated (45). Besides, a shift of Th1 phenotype to Th2 during pregnancy has been shown to encourage vigorous production of antibodies that not only combat infections during pregnancy but also offer passive immunity to the fetus (46). In the present study, we have observed that serum IL-2 and IFN- γ concentrations are down-regulated, whereas IL-4 concentrations are not altered in gestational diabetic mothers. Interestingly, the levels of IL-10, a Th2 cytokine, are increased in these diabetic mothers. Our observations suggest that diminished concentrations of Th1 cytokines and increased IL-10 levels may be implicated in maintaining the pregnancy in gestational diabetic women. However, the lack of changes in circulating IL-4 levels may be responsible for the induction of diabetes mellitus. Our idea can be supported with the observations of Muller *et al.* (17) who have shown that diabetes susceptibility was more associated with reduction of IL-4 than with induction of IFN- γ in islets of BALB/c male mice rendered diabetic. Similarly, Wood *et al.* (20) have reported diminished expression of IL-4 in thymocytes of diabetic mice. We have recently shown that a decrease in IL-4, but not in IL-10, favors the onset of diabetic pregnancy in rats (47) and mice (48). The high secretion of IL-10 may be because of an elevated concentration of cortisol during pregnancy (49). Indeed, it has been shown that cortisol, concentrations of which are increased in pregnant women (49), induces an increase in IL-10 secretion (50). Moreover, in the present study, the ratio of cytokines demonstrates that in gestational diabetic women, the Th1 phenotype is down-regulated. In this context, we have recently demonstrated that Th1 phenotype is down-

regulated during diabetic pregnancy in rats (47) and mice (48).

In macrosomic rats (47), we have previously demonstrated an increase in the concentrations of Th1 cytokines (IL-2 and IFN- γ) and a decrease in IL-10 levels without any modifications in IL-4 concentrations. However, comparing the ratios of Th1/Th2 cytokines, we noticed an increase in Th1 phenotype in these macrosomic babies. The physiological importance of Th1 phenotype in macrosomia is not well understood. Ours is the first study to show a Th1 phenotype of T cells in human macrosomia, although fully activated T cells are detected in the cord blood of infants and mothers with type I diabetes but not in infants from normal mothers (51). Moreover, from birth up to 15 yr of age, the percentage of total T cells was higher in children of type 1 diabetic mothers than in those of healthy mothers (52). We have shown that T cells of macrosomic pups also present a defect in intracellular calcium signaling (53). Because macrosomic infants in the present study exhibited up-regulation of Th1 cytokines, it is possible that these activated T cells may contribute, in part, to the development of diabetes and obesity in a later stage of life in these infants (54, 55).

To sum up, we can state that GDM is associated with hyperinsulinemia, hyperglycemia, high concentrations of leptin and inflammatory mediators such as TNF- α and IL-6, and low adiponectin levels. These GDM subjects are associated with a down-regulated Th1 phenotype of T cells. The macrosomic offspring of women with GDM exhibit hyperinsulinemia and low levels of leptin, adiponectin, TNF- α , and IL-6, along with an up-regulated Th1 phenotype of T cells. Additional studies are required to explore the implication of T cell subtypes in the onset of inflammation-related diabetes/obesity and their role in the modifications of adipokines in GDM and macrosomia.

Acknowledgments

We thank the Ministry of Higher Education, Republic of Benin, which granted a scholarship to J.-M.A. We express our sincere thanks to the French Embassy at Cotonou, Benin, and the Islamic Development Bank for the sanction of a scholarship to one of the authors (A.Y.).

Received May 8, 2006. Accepted July 12, 2006.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. N. A. Khan, Head, Department of Physiology, Faculty of Life Sciences, University of Burgundy, 6, Boulevard Gabriel, Dijon 21000, France. E-mail: Naim.Khan@u-bourgogne.fr.

References

- Gabbe S 1986 Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 315:1025–1026
- Kim C, Newton KM, Knopp RH 2002 Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25:1862–1868
- Cox NJ 1994 Maternal component in NIDDM transmission. How large an effect? *Diabetes* 43:166–168
- Greenberg AS, McDaniel ML 2002 Identifying the links between obesity, insulin resistance and β -cell function: potential role of adipose-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 32:24–34
- Diez JJ, Iglesias P 2003 The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human and possible biological roles. *Eur J Endocrinol* 148:293–300
- Coppack SW 2001 Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 60:349–356
- Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM 2002 TNF- α is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 51:2207–2213
- Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajos P, Salamon F, Turi Z, Kovacs M, Vargha P, Karadi I 2002 Tumour necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 56:93–99
- Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T 1998 Tumor necrosis factor- α in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2907–2910
- Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Csakany GM, Speer G, Kovacs M, Gero G, Karadi I, Winkler G 2002 The pathophysiological influence of leptin and the tumor necrosis factor system on maternal insulin resistance: negative correlation with anthropometric parameters of neonates in gestational diabetes. *Gynecol Endocrinol* 16:453–460
- Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Bieglmayer C, Schneider B, Ludvik B, Prager R, Waldhausl W 2001 Increased plasma leptin in gestational diabetes. *Diabetologia* 44:164–172
- Simmons D, Breier BH 2002 Fetal overnutrition in Polynesian pregnancies and in gestational diabetes may lead to dysregulation of the adipoinular axis in offspring. *Diabetes Care* 25:1539–1544
- Festa A, Shnawa N, Krugluger W, Hopmeier P, Scherthner G, Haffner SM 1999 Relative hypoleptinaemia in women with mild gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 16:656–662
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196–4200
- Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B 2000 Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2084–2089
- Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Bart D 1997 NIDDM as a disease of the innate immune system association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286–1292
- Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H 2002 Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF- α or its receptors. *Diabetologia* 45:805–812
- Rabinovitch A 1994 Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43:613–621
- Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH 2000 Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21:479–483
- Wood SC, Rao TD, Frey AB 1999 Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALE/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. *Cell Immunol* 192:1–12
- Kaplan LA, Cline D, Gartside P, Burstein S, Sperling M, Stein EA 1982 Hemoglobin A1 in hemolysates from healthy and insulin-dependent diabetic children, as determined with a temperature-controlled minicolumn assay. *Clin Chem* 28:13–18
- Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J 2003 Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *J Nutr* 133:1674–1683
- Kurishita M, Nakashima K, Kozu H 1994 A retrospective study of glucose metabolism in mothers of large babies. *Diabetes Care* 17:649–652
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A 2004 Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25:4–7
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R 2005 Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111:1448–1454
- Sternberg EM 1992 The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 117:854–866
- Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P 2000 Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2970–2973
- Trayhurn P, Wood SI 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Brit J Nutr* 92:347–355
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79–83
- Meller M, Qiu C, Vadachkoria S, Abetew DF, Luthy DA, Williams MA, Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. *Physiol Res* 2005 Dec 12 [Epub ahead of print]
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM 1994 Tumor necrosis factor α inhibits signalling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4854–4858
- Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JE, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA 2002 Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 51:1884–1888
- Ruan H, Lodish HF 2003 Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev* 14:447–455

34. Lihn AS, Richelsen B, Pedersen SB, Haugaard SB, Rathje GS, Madsbad S, Andersen O 2003 Increased expression of TNF- α , IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1072–E1080
35. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, Lee YH, IT Huang, SC Ho, CH Chu 2005 Maternal adiponectin concentrations at 24 to 31 weeks of gestation: negative association with gestational diabetes mellitus. *Nutr* 21:1095–1099
36. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold I, Friedman JM 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425–432
37. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543–546
38. McLachlan KA, O'Neal D, Jenkins A, Alford FP 2006 Do adiponectin, TNF α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* 22:131–138
39. Sivan E, Whittaker PG, Sinha D, Homko CJ, Lin M, Reece EA, Boden G 1998 Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *Am J Obstet Gynecol* 179:1128–1132
40. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K 1997 Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029–1033
41. 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
42. Matarese G, La Cava A, Sanna V, Lord GM, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S 2002 Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol* 23:182–187
43. Weiss R, Dufour S, Groszmann A, Petersen K, Dziura J, Taksali SE, Shulman G, Caprio S, Weiss R, Dufour S, Groszmann A, Petersen K, Dziura J, Taksali SE, Shulman G, Caprio S 2003 Low adiponectin levels in adolescent obesity: a marker of increased intramyocellular lipid accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2014–2018
44. Montague G, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S 1998 Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47:1384–1391
45. Raghupathy R 2001 Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 13:219–327
46. Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV 1998 Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun* 245:933–938
47. Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A 2006 N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. *J Autoimmun* 26:268–277
48. Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA 2006 PPAR α deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: modulation of T cell differentiation. *Endocrinology* 147:4410–4418
49. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, Link AA, Dimitrov MA, Fisher S, Crane M, Kanik KS, Chrousos GP 2001 IL-12, TNF- α , and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4933–4938
50. Volk T, Dopfmer UR, Schmutzler M, Rimpau S, Schnitzler H, Konertz W, Hoeflich C, Docke WD, Spies CD, Volk HD, Kox WJ 2003 Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. *Cytokine* 24:237–243
51. Giordano C 1990 Immunobiology of normal and diabetic pregnancy. *Immunol Today* 11:301–303
52. Roll U, Scheeser J, Standl E, Ziegler AG 1994 Alterations of lymphocytes subsets in children of diabetic mothers. *Diabetologia* 37:1132–1141
53. Guermouche B, Yessoufou A, Soulimane N, Merzouk H, Moutairou K, Hichami A, Khan NA 2004 N-3 fatty acids modulate T-cell calcium signaling in obese macrosomic rats. *Obes Res* 12:1744–1753
54. Lapolla A, Dalfrà MG, Sanzari M, Fedele D, Betterle C, Masin M, Zanchetta R, Faggian D, Massotti M, Nucera V, Plebani M 2005 Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine* 31:280–287
55. Merzouk H, Khan NA 2003 Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects? *Clin Sci* 105:519–529

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

J Clin Endocrinol Metab 2006; **91**: 4137-4143.

Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia

JM. Atègbo, O. Grissa, A. Yessoufou, A. Hichami, KL. Dramane, K. Moutairou, A. Miled, A. Grissa, M. Gerbi, Z. Tabka and NA. Khan

UPRES EA 4183 “Lipids and Cellular Signalling” (JM. A., A.Y., A. H., NA. K.), Faculty of Life Sciences, University of Burgundy, Dijon 21000, France ; Laboratories of Animal Physiology (JM. A., KL. D.) and Cell Biology and Physiology (A. Y., K. M.), Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin; and Departments of Physiology and Functional Exploration (O. G., A. G., Z., T.), Biochemistry (A., M.), and Gynaecology (M., J.), University Hospital Farhat Hached, 4000 Sousse, Tunisia.

Résumé:

L'implication des adipokines et des cytokines Th1 et Th2 au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie est peu connue. Le but de cette étude est d'évaluer le profil de ces hormones et de ces cytokines chez des bébés macrosomiques nés de mères diabétiques. A ce sujet, 59 femmes, diagnostiquées comme ayant le diabète gestationnel, âgées de 19 à 42 ans et leurs bébés macrosomiques (Poids moyen : $4,35 \pm 0,06$ kg) et 60 femmes gestantes témoins, d'âge similaire et leurs nouveau-nés (Poids Moyen : $3,22 \pm 0,08$ kg) ont été sélectionnés. Les adipokines sériques (adiponectine et leptine) ont été quantifiées par un kit ELISA (microarray) et les concentrations des cytokines Th1 (IL-2 et INF- γ) et Th2 (IL-4 et IL-10) ont été déterminées par la méthode ELISA. Les concentrations de l'adiponectine étaient faibles alors que celles de la leptine, de l'interleukine (IL)-6 et du TNF- α étaient significativement élevées chez les mères diabétiques comparées aux mères témoins. Les taux de ces adipokines étaient bas chez les bébés macrosomiques, en comparaison aux nouveau-nés témoins. Les concentrations des cytokines Th1 avaient diminué alors que celles de l'IL-10 (Th2) étaient significativement élevées chez les mères diabétiques comparées aux mères témoins. Les enfants macrosomiques présentaient des taux élevés en cytokines Th1 et de faible valeur en IL-10, comparés aux enfants témoins. Les concentrations de IL-4 restent inchangées entre les

mères d'une part et d'autre part entre leurs bébés. Au cours du diabète gestationnel, le rapport des cytokines Th1/Th2 se déplace en faveur d'une réponse immunitaire de type Th2 tandis que la macrosomie est associée à une dominance de la réponse immunitaire de type Th1. Le diabète gestationnel est corrélé à une diminution de l'adiponectine et une augmentation de la leptine, d'IL-6 et de TNF- α , tandis que la macrosomie est associée à une baisse de toutes ces hormones relatives à l'obésité.

Mots Clés : Diabète gestationnel, macrosomie, adipokine, interleukine, interféron, cellules T.

Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and their macrosomic offspring

Publication n°2

Publication n°2

Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and their macrosomic offspring

Oussama Grissa, Jean-Marc Atègbo, Akadiri Yessoufou, Zouheir Tabka, Abdelhedi Miled, Mehdi Jerbi, Karim L. Dramane, Josiane Prost, Kabirou Moutairou, Aziz Hichami, Naim Akhtar Khan

Translational Research 2007

Objectif de l'étude

Les nouveau-nés issus de mères diabétiques présentent un risque élevé de développer la macrosomie néonatale et le stress oxydatif. Le but de cette étude a été d'évaluer le statut antioxydant et le profil des lipides circulants des mères diabétiques et de leurs bébés macrosomiques comparés à des mères contrôles et à leurs progénitures.

Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia

OUSSAMA GRISSA, JEAN-MARC ATÈGBO, AKADIRI YESSOUFOU, ZOUHAIR TABKA, ABDELHEDI MILED, MEHDI JERBI, KARIM L. DRAMANE, KABIROU MOUTAIROU, JOSIANE PROST, AZIZ HICHAMI, and NAIM AKHTAR KHAN

SOUSSE, TUNISIA; DIJON, FRANCE; AND COTONOU, BÉNIN

Fetuses from mothers with gestational diabetes are at increased risk of developing neonatal macrosomia and oxidative stress. We investigated the modulation of antioxidant status and circulating lipids in gestational diabetic mothers and their macrosomic babies and in healthy age-matched pregnant women and their newborns. The serum antioxidant status was assessed by employing anti-radical resistance kit (KRL; Kirial International SA, Couternon, France) and determining levels of vitamin A, C, and E and the activity of superoxide dismutase (SOD). Circulating serum lipids were quantified, and lipid peroxidation was measured as the concentrations of serum thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). As compared with non-diabetic mothers, gestational diabetic women exhibited decreased levels of vitamin E and enhanced concentrations of vitamin C without any changes in vitamin A. Vitamin A and C levels did not change in macrosomic babies except vitamin E whose levels were lower in these infants than in the newborns of non-diabetic mothers. Gestational diabetes mellitus (GDM) and macrosomia were also associated with impaired SOD activities and enhanced TBARS levels. Globally, total serum antioxidant defense status in diabetic mothers and their macrosomic babies was diminished as compared with control subjects. Triglyceride and cholesterol concentrations did not differ significantly between gestational diabetic and control mothers; however, macrosomia was associated with enhanced plasma cholesterol and triglyceride levels. These results suggest that human GDM and macrosomia are associated with downregulation of antioxidant status, and macrosomic infants also exhibit altered lipid metabolism. (*Translational Research* 2007;150:164-171)

Abbreviations: BMI = body mass index; GDM = gestational diabetes mellitus; GSH = glutathione; PUFA = peroxidized polyunsaturated fatty acid; RBC = red blood cell; RT = retention time; SD = standard deviation; SOD = superoxide dismutase; TBARS = thiobarbituric acid-reactive substances

Gestational diabetes mellitus (GDM) is the most frequent metabolic disorder of pregnancy, occurring in 1% to 10% of all pregnancies.¹ As far as the African subcontinent is concerned, Djrolo et al² have observed a prevalence of

5.2% of GDM in Beninese women with a high tendency of cesarean delivery. Similarly, a study con-

Supported by the Ministry of High Education, Republic of Bénin (to J-M.A.), the French Embassy at Cotonou, Bénin, and the IDB (to A.Y.). Submitted for publication on December 22, 2006; revision submitted March 7, 2007; accepted for publication March 10, 2007.

Reprint requests: Prof. Naim A. Khan, Department of Physiology, Faculty of Life Sciences, University of Burgundy, 6 Boulevard Gabriel, Dijon 21000, France; e-mail: Naim.Khan@u-bourgogne.fr.

1931-5244/\$ – see front matter

© 2007 Mosby, Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.trsl.2007.03.007

From the Department of Physiology and Functional Explorations, the Department of Biochemistry, and the Department of Gynaecology, Farhat Hached University Hospital, 4000 Sousse, Tunisia; the University of Burgundy, UPRES Lipids and Nutrition, Faculty of Life Sciences, Dijon, France; and the Laboratory of Animal Physiology and the Laboratory of Cell Biology and Physiology, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin.

ducted in Tunisia by Khrouf et al³ has shown an incidence of 7.75% of GDM. The major complications of GDM include maternal hypertensive disorders, neonatal hypoglycemia, jaundice and birth trauma including shoulder dystocia.⁴ Although great controversy exists regarding the clinical outcome of GDM,⁵ it is clear that several morbidities occur with an increased frequency in offspring of gestational diabetic mothers. The most commonly reported effect on the newborn is macrosomia, which is usually defined as birth weight above either 4 kg or birth weight above the 95th percentile for the gestational age. Available evidence indicates an association between maternal hyperglycemia during pregnancy and childhood obesity.⁶ In fact, several alterations in carbohydrate and lipid metabolism are also observed in infants of diabetic mothers and are thought to be a consequence of maternal hyperglycemia leading to fetal hyperglycemia and hyperinsulinemia.⁷⁻⁹ High blood glucose levels in these newborns induce oxidative stress, which in turn evokes the production of highly reactive oxygen radicals, toxic to cells, particularly to the plasma membranes where these radicals interact with the lipid bilayer.¹⁰

For assessing the global antioxidant status, 3 major approaches have been employed: (1) determination of endogenous antioxidant levels, (2) measurement of the products of oxidized macromolecules (lipids, DNA, and proteins), and (3) direct detection of free radicals. Assessments of lipid peroxidation by free radicals include the analysis of lipid peroxides, isoprostanes, diene conjugates, and breakdown products of lipids (eg, malonaldehyde, ethane, pentane, and 4-hydroxynonanal).¹¹ Among these products, malonaldehyde is often used as a reliable marker of lipid peroxidation assessed by measuring the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), although this assay lacks the specificity.¹²

The biological effects of free radicals are normally controlled *in vivo* by a wide range of antioxidants, such as vitamin A, C, and E, glutathione (GSH), and antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase, GSH peroxidase, and GSH reductase. Vitamin E, the main liposoluble antioxidant in human beings, scavenges peroxy-radicals produced during lipid peroxidation.¹³ Vitamin E can transfer its phenolic hydrogen to a peroxy free radical of a peroxidized polyunsaturated fatty acid (PUFA), thereby breaking the radical chain reaction and preventing the peroxidation of PUFA in cellular and subcellular membrane phospholipids. Vitamin A and C also have the ability to react directly with reactive oxygen species. Among antioxidant enzymes, SOD is a unique and valuable asset as a biological tool to explore reaction mechanisms. SOD inhibits radical reactions, which leads to

oxidative damage, and prevents reduction of iron ions by superoxide.¹⁴ The development of biochemical techniques permitted scientists to quickly identify the isoforms of SOD like MnSOD, CuZnSOD, and FeSOD. Nitric oxide radical provided the next clue as to how SOD might be playing a critical biological role. Cu-containing or Zn-containing superoxide dismutase (ie, SOD1, the major SOD in mammalian cells) catalyzes the dismutation of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) into H_2O_2 and O_2 .^{13,15} and is an important antioxidant defense system.¹⁶ A coproduct of SOD is H_2O_2 , which is converted to H_2O by catalase and the selenium-dependent GSH peroxidase. Lipid hydroperoxides are detoxified to alcohols by GSH peroxidase. Another type of GSH peroxidase (phospholipid peroxide GSH peroxidase) acts on phospholipid peroxides in membrane structures.¹¹

To our knowledge, no study has directly investigated the antioxidant status in macrosomia and GDM. As one cause of macrosomia is GDM, and the hyperglycemia in GDM mothers may lead to increased oxidative stress, we hypothesized that macrosomic infants would, at birth, exhibit a decreased antioxidant defense, which could cause metabolic disorders during their adulthood. Therefore, it was thought worthwhile to undertake the current study to evaluate the antioxidant status of macrosomic babies born to gestational diabetic women. Glucose, insulin, and serum lipids were also investigated to characterize the diabetic state of pregnant subjects and their babies.

MATERIALS AND METHODS

Subjects. A total of 59 gestational diabetic mothers with their respective macrosomic babies were recruited in the Department of Gynaecology, Farhat Hached University Hospital, Tunisia. Medical records were screened by specialist clinicians. In GDM patients, diabetes appeared at second or third trimester of pregnancy as determined by oral glucose tolerance test according to the World Health Organization criteria. These ladies were between 19 and 42 years old. In total, 75% of the diabetic mothers had an episiotomy during delivery. They were hyperglycemic and hyperinsulinemic at the diagnosis of the disease. As control subjects, 60 healthy age-matched pregnant women and their newborn babies were selected.

Newborns were immediately weighed after delivery. Babies from diabetic mothers whose birth weight was 2 standard deviations (SDs) greater than the mean birth weight of the control infants were considered as macrosomic infants and included in the study. The mean birth weight of macrosomic babies, in this study, was 4.35 ± 0.06 kg, whereas that of control infants was 3.22 ± 0.08 kg with a respective body mass index (BMI) of 33.84 ± 0.65 kg/m² and 13.38 ± 0.22 kg/m².

Selected control women had no significant history of illness, no pregnancy-related complications, and no risk factor

Table I. Characteristics of mothers and their offspring

	Mothers		Newborns	
	Control	Diabetic	Control	Macrosomic
Number	60	59	60	59
Female/male ratio	60/0	59/0	31/29	36/33
Age (month/years)	19–42 years	22–42 years	<1 month	<1 month
Body weight (kg)	—	—	3.22 ± 0.08	4.35 ± 0.06*
BMI (kg/m ²)	—	—	13.38 ± 0.22	33.84 ± 0.65*
Cranial perimeter (cm)	—	—	34.17 ± 0.21	35.87 ± 0.29
Macrosomia history (%)	0	43	—	—
Episiotomy (%)	35	75	—	—
Fasting glucose (mmol/L)	4.86 ± 0.71	6.87 ± 0.63*	5.51 ± 0.38	4.99 ± 0.38
Insulinemia (μIU/mL)	5.98 ± 1.13	11.41 ± 4.71*	5.77 ± 0.88	7.78 ± 3.15*

Note: Values are means ± SDs.

*Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls is as follows: $P < 0.01$.

for gestational diabetes, including normal glucose tolerance tests during the first and third trimesters of pregnancy. An attempt was made to match these women to diabetic subjects, at least regarding maternal age, BMI as determined by the weight and height of patients, parity, gestational age, and mode of delivery. Both diabetic and control mothers were offered regular examinations of their offspring. The characteristics of mothers and newborns are shown in Table I.

This study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki (1989) of the World Medical Association and was approved by the Sousse Farhat Hached Hospital Committee for Research on Human Subjects (Tunisia). Informed written consent was obtained from all subjects. Our experimental protocol conforms to the relevant ethical guidelines for human research.

Blood samples. From each gestational diabetic or control mother, fasting venous blood samples were collected, at the third trimester of pregnancy, in tubes either containing or not containing ethylenediaminetetraacetic acid to obtain plasma and serum, respectively. The blood samples of the babies were collected at delivery. Serum or plasma was obtained by centrifugation ($1000g \times 20$ min). Plasma was immediately used for glucose determinations. Serum was aliquoted and frozen at -80°C for further determinations of vitamins, insulin, lipid concentrations, and total antioxidant status. After removal of plasma, erythrocytes were washed 3 times with 2 volumes of isotonic saline (NaCl 0.9%, vol/vol). Erythrocytes were lysed with cold distilled water (1/4, vol/vol), stored in refrigerator at 4°C for 15 min, and the cell debris was removed by centrifugation ($2000g \times 15$ min). Erythrocyte lysates were assayed to determine superoxide dismutase activity.

Determination of plasma glucose, serum insulin, and lipid concentrations. Serum triglycerides and total cholesterol and free-cholesterol concentrations were determined by using enzymatic methods, according to the instructions furnished with the kit (Boehringer, Mannheim, Germany). Plasma fasting glucose was determined by glucose oxidase method using a glucose analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, Calif). Serum concentrations of insulin were deter-

mined by using Insulin IRMA kit (Ref IM3210; Immunotech, Beckman Coulter Inc) with a detection limit of $0.5 \mu\text{IU/mL}$. The interassay coefficient of variability was 3.3% and 4%, respectively, for the concentrations 13 IU/mL and 54 IU/mL.

Determination of vitamins A and E levels. Serum α -tocopherol (vitamin E) and retinol (vitamin A) were extracted by hexane, dried under nitrogen, resuspended in methanol, and then quantified by reverse-phase high-performance liquid chromatography.¹⁷ The stationary phase was constituted of grafted silica (C18 column, HP ODS Hypersil C18; 200 mm \times 4.6 mm; Lara spiral, maintenance temperature of analytical column, 35°C). The mobile phase was a mixture of methanol/water (98/2, vol/vol) at a flow rate of 1 mL/min. This method was used to quantify both vitamins A and E in a single chromatographic run in the presence of an internal standard, Tocol (Lara Spiral, Couternon, France), which was added to the samples before hexane extraction. The retention time (RT) of vitamins was determined by injection of the authentic standard of vitamin A (RT around 5 min), Tocol (RT around 8 min), and vitamin E (RT around 15 min). The peaks were detected by an ultraviolet detector set at 292 nm for vitamin E and Tocol and at 325 nm for vitamin A.

Determination of vitamin C levels. Total ascorbate (vitamin C) concentrations were determined in serum using the method of Roe and Kuether.¹⁸ After protein precipitation with 10% trichloroacetic acid and centrifugation, the supernatant (500 μL) was mixed with 100 μL of DTC reagent (9N sulfuric acid containing 2,4-dinitrophenylhydrazine 3%, thiourea 0.4%, and copper sulfate 0.05%) and incubated at 37°C for 3 h. After the addition of 750 μL of 65% (vol/vol) sulfuric acid, the absorbency was recorded at 520 nm.

Determination of erythrocyte SOD activity. Erythrocyte superoxide dismutase (SOD EC 1.15.1.1) activity was determined using Ransod kit (Randox, Crumlin, United Kingdom) on a Ra-50 spectrophotometer (Beckman, France). For SOD activity, xanthine and xanthine oxidase were used to generate superoxide radicals reacting with 2-(4-iodophenyl) 3-(4-nitrophenol)-5 phenyl tetrazolium chloride to form a red formazan dye.¹⁹ SOD activity was then measured at 505 nm by the degree of inhibition of the reaction of washed hemolysed

erythrocytes with 2 mL of cold double-distilled water. One unit of SOD activity, expressed per gram of hemoglobin present in erythrocytes, is defined as the amount of the enzyme that gives an inhibition percentage (from 20% to 50%) of the erythrocyte hemolysis reaction.

Determination of serum TBARS. Serum lipid peroxidation by free radical was determined by specifically measuring the TBARS assay in serum according to a modified method of Quintanilha et al.²⁰ Serum was added with the trichloroacetic acid, thiobarbituric acid, and hydrochloric acid (15% wt/vol, 0.375% wt/vol, 0.25 M vol/vol, respectively) and butylated hydroxytoluen (2% in ethanol, vol/vol). After 30 min of incubation at 80°C, the tubes were allowed for cooling. After centrifugation (3000g × 10 min, 4°C), the supernatant was obtained and the absorbance measurement was made at 535 nm. TBARS were expressed as μmol of malondialdehyde per liter of serum (μM).

Serum antioxidant defense. Serum resistance to free radical aggression was tested as the capacity of red blood cell (RBC) to withstand free radical-induced hemolysis and was measured as per method of Blache and Prost,²¹ who have clearly demonstrated that, if at least 1 component of the antiradical detoxification system (antioxidants, enzymes) is impaired, a shift of the hemolysis curve is observed toward shorter times. Briefly, washed RBCs were diluted (1:40, vol/vol) with anti-radical resistance [Kit Radicaux Libres (KRL; Kirial International SA, Couteron, France)] buffer (300 mosm/L) and 50 μL of RBCs suspension was assayed in a 96-well microplate coated with a free radical generator (GRL, Kirial International SA). The kinetic of RBCs resistance to hemolysis was determined at 37°C by continuous monitoring of changes in absorbance at 620 nm. The time to reach 50% of total hemolysis was retained for group comparisons.

Statistical analysis. Values are mean \pm SD. Statistical analysis of data was carried out using STATISTICA (version 4.1; Stat-soft, Paris, France). Data were evaluated by analysis of variance. The Duncan multiple-rRange test was employed for the comparison between gestational diabetic patients or macrosomic newborns and their corresponding control subjects. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Serum vitamins A, C, and E levels. As compared with non-diabetic mothers and their children, gestational diabetic women and their macrosomic newborns exhibited no significant changes in vitamin A concentrations (Fig 1). However, vitamin E levels were significantly decreased in gestational diabetic patients and their overweight babies compared with their corresponding controls (Fig 1). Vitamin C concentrations did not significantly differ between macrosomic newborns and control infants, although differences were noticed between their mothers with significant increased levels in gestational diabetic women (Fig 2).

Antioxidant enzyme (SOD) activity. Erythrocyte SOD activity was significantly reduced in macrosomic babies compared with that in control infants. Similarly, gesta-

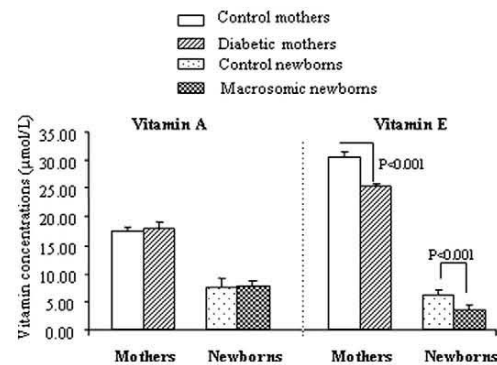


Fig 1. Serum vitamins A and E concentrations in diabetic and control women and their newborns. Serum vitamins A and E concentrations were determined as described in the Materials and Methods section. Values are means \pm SDs. $n = 60$ control mothers/babies; $n = 59$ diabetic mothers/macrosomic babies. Each value represents the mean of 3 determinations. Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls is as follows: $P < 0.001$.

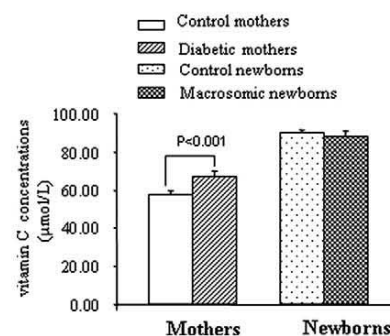


Fig 2. Serum vitamin C concentrations in control and diabetic women and their newborns. Serum vitamin C concentrations were determined as described in the Materials and Methods section. Values are means \pm SDs. $n = 60$ control mothers/babies; $n = 59$ diabetic mothers/macrosomic babies. Each value represents the mean of 3 determinations. Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls is as follows: $P < 0.001$.

tional diabetic mothers showed a lower level of SOD activity than control mothers (Fig 3).

Serum lipid levels. Triglyceride and total-cholesterol did not differ between gestational diabetic and control mothers. Free-cholesterol was lower in diabetic mothers than control mothers. Triglyceride, total-cholesterol, and free-cholesterol were significantly higher in macrosomic babies compared with control offspring (Table II).

Serum TBARS concentrations. Concentrations of serum TBARS were higher in gestational diabetic mothers and their macrosomic babies than control healthy women and their newborns (Fig 4).

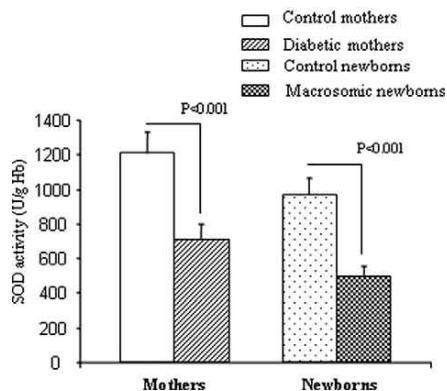


Fig 3. Erythrocyte SOD activity in control and diabetic women and their newborns. Erythrocyte SOD activity was determined as described in the Materials and Methods section. Values are means \pm SDs. $n = 60$ control mothers/babies; $n = 59$ diabetic mothers/macrosomic babies. Each value represents the mean of 3 determinations. Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls is as follows: $P < 0.001$.

Serum antioxidant capacity. Gestational diabetic mothers, as well as their macrosomic newborns, showed a significant decrease in total serum antioxidant defense compared with control mothers and their babies, respectively (Fig 5).

DISCUSSION

The role of oxidative stress in diabetes mellitus has been well investigated.²²⁻²⁴ However, no data are available on the antioxidant status in macrosomic infants born to gestational diabetic mothers, although diabetic pregnancy represents an important risk factor for fetal overnutrition and development of obesity in the offspring at adulthood.^{25,26} As regards the newborns of GDM mothers that were not macrosomic, we would like to mention that all subjects were recruited in Tunisia and the experimental study was performed in France. Only the macrosomic infants of GDM mothers were selected and included in the study. Unfortunately, we do not have any data regarding the non-macrosomic babies born to GDM mothers. However, we have previously observed in another study, performed on gestational diabetic rats, that the normal-sized offspring (non-macrosomic) of diabetic dams were neither hyperglycemic nor hyperinsulinemic at birth. They had normal growth rates and did not show any significant difference from control pups as far as the lipid metabolism is concerned (unpublished results). In the current study, GDM and macrosomia were found associated with a decreased level of vitamin E without any changes in vitamin A levels. In addition, vitamin C levels were increased in gestational diabetic mothers,

without any significant modifications in their macrosomic offspring compared with respective control subjects. There have been conflicting reports on plasma vitamin concentrations in diabetes mellitus. Yessoufou et al¹⁰ have shown, in type 2 diabetic patients, diminished vitamin E levels. On the other hand, Makimattila et al²⁷ have reported that plasma vitamins C and E levels in type 2 diabetic patients were not significantly decreased. Sundarm et al²⁸ have reported low levels of vitamins E and C in diabetic patients. However, the findings of the current study are in close agreement with those obtained by Peuchant et al¹⁹ who have observed that plasma levels of vitamin E were significantly lower in pregnant women with GDM compared with control subjects, without any changes in vitamin A. We have previously suggested that the decreased level of vitamin E²³ could be from its high utilization rate as this vitamin may be used to protect against oxidative stress. It has been established that oxidative stress is induced by both the increases in free radicals and the disturbance in the free radical scavenging system in diabetes mellitus.^{13,29} The inverse corelationship between a decreased level of vitamin E and a high level of vitamin C, in GDM mothers, may be because vitamin C and reduced glutathione regenerate vitamin E.^{13,30} Low levels of vitamin E are correlated with hyperglycemia in GDM mothers. It has been reported that chronic hyperglycemia may increase oxidative stress, which may account for low vitamin E levels.²⁴ In addition, diminished vitamin E levels have also been observed in diabetic patients with increased lipid peroxidation products associated with hypertriglyceridaemia.³¹ In the current study, the high level of vitamin C in GDM mothers may be caused by hyperglycemia in these subjects. Indeed, it has been shown that L-ascorbate (vitamin C) is synthesized from glucose by the D-glucuronic acid pathway in mammals.³²

As far as the antioxidant enzymes are concerned, the current study showed that SOD activity decreased in gestational diabetic mothers and their macrosomic offspring compared with healthy controls. Our results are in accordance with those obtained by other investigators in human beings and experimental studies. Biri et al³³ and Chaudhari et al³⁴ have observed an impaired SOD activity in pregnant women with GDM compared with normal pregnant women. Similar results have been observed by Peuchant et al¹⁹ who have shown a decreased SOD activity in gestational and type 1 diabetic pregnant women. Other investigators^{10,35-37} have also noticed decreased SOD activity in human type 2 diabetes compared with controls. We have also observed a decrease in SOD activity in diabetic rats and their macrosomic offspring.²⁵ Dincer et al³⁸ have observed a diminished SOD activity in liver and lung of neonate

Table II. Serum lipid concentrations

Serum lipids	Mothers		Newborns	
	Control n = 60	Diabetic n = 59	Control n = 60	Macroscopic n = 59
Triglycerides (mM)	3.07 ± 0.22	3.07 ± 0.25	1.02 ± 0.04	1.30 ± 0.04*
Total-cholesterol (mM)	6.33 ± 0.32	5.37 ± 0.65	0.83 ± 0.21	1.34 ± 0.17*
Free-cholesterol (mM)	12.11 ± 0.34	9.30 ± 0.93*	6.66 ± 0.30	7.55 ± 0.15*

Note: Values are means ± SDs.

*Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls is as follows: $P < 0.05$.

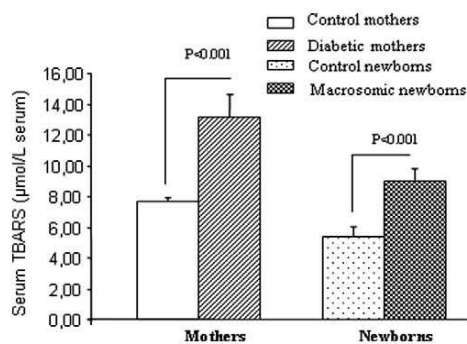


Fig 4. Serum TBARS concentrations. Serum TBARS concentrations were determined as described in the Materials and Methods section. Values are means ± SDs. $n = 60$ control mothers/babies; $n = 59$ diabetic mothers/macrosomic babies. Each value represents the mean of 3 determinations. Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls is as follows: $P < 0.001$.

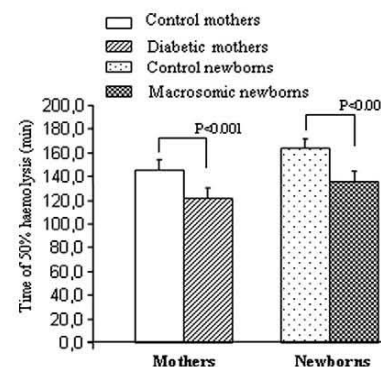


Fig 5. Total serum antioxidant defense in control and diabetic women and their newborns. Serum total antioxidant defense was determined as described in the Materials and Methods section. Values are means ± SDs. $n = 60$ control mothers/babies; $n = 59$ diabetic mothers/macrosomic babies. Each value represents the mean of 3 determinations. Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls is as follows: $P < 0.001$.

streptozotocin-induced diabetic rats. However, Aydin et al³⁹ have reported that SOD activity increased in type 2 diabetes compared with controls. Ruiz et al⁴⁰ did not observe any significant difference in SOD activity in type 1 diabetes compared with controls. The reason for this discrepancy in SOD activity in diabetes might be attributed to the treatments given to the patients, the associated complications, and the duration of the disease.^{10,23,41,42} As far as SOD activity in macrosomia is concerned, only one study has shown diminished SOD activity in infants born to gestational diabetic mothers and our results are substantiated by this report.⁴³

Gestational diabetic as well as control pregnant mothers, in the current study, exhibited hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia, although these parameters were not statistically different. However, macrosomic babies showed high levels of serum triglyceride and total and free cholesterol compared with control infants. Our results corroborate several studies that have shown that total cholesterol and triglyceride are increased significantly throughout pregnancy and that no significant difference exists between healthy and diabetic women.^{44,45}

High lipids and increased oxidative stress in diabetic patients might have enhanced the susceptibility of lipid peroxidation. Gestational diabetic mothers and their macrosomic offspring exhibited a significant increase in serum TBARS in accordance with the observations of several authors.^{46,47} Our finding implies that TBARS are one promising clinical marker of oxidative stress. Bis-Gluchowska et al⁴⁸ have also shown a high level of TBARS in the cord blood of newborns delivered to mothers with type 1 diabetes, which suggests that maternal diabetes during pregnancy may induce oxidative stress in the newborn. On the other hand, Mazzanti et al⁴⁹ have reported that basal levels of peroxidation of the platelet membranes and TBARS levels were increased in GDM patients in comparison with control subjects; hence, oxidative stress in GDM women might be involved in cellular dysfunction. In fact, lipid peroxidation has been involved in a variety of physiological, pathological, and clinical conditions, including pregnancy-related complications, mainly in preeclampsia and diabetes.⁴⁷

Our report is the first one on antioxidant status in macrosomia related to human GDM. The altered antioxidant defense observed in these macrosomic infants at birth could cause metabolic disorders during their adulthood. Indeed, we have previously reported, in rats,²⁵ the potential long-term consequences of the altered antioxidant status in macrosomic offspring born to diabetic dams. Hence, the antioxidant status of macrosomic offspring, during adulthood, remained low. At 2 and 3 months of age, they exhibited (1) hyperglycemia and hyperinsulinemia, (2) high plasma TBRAS levels, (3) diminished plasma oxygen radical absorbance capacity that reflects the low antioxidant defense, (4) low vitamins C and A concentrations, and (5) the decreased activities of SOD and other antioxidant enzymes like glutathione peroxidase and glutathione as compared with the control adult offspring. Other investigators³⁵ have also shown in human macrosomic infants that macrosomia was associated with alterations in lipoprotein compositions and concentrations at birth, and some of them persisted even after 1 month of life; hence, they might play a role in the pathogenesis of diabetes and atherosclerosis at adulthood. These investigators also reported that macrosomic newborns as compared with controls had higher serum lipids, apolipoprotein A-I and B-100, and lipoprotein (very low-density lipoprotein, low-density lipoprotein, high-density lipoprotein-2, and high-density lipoprotein-3) levels. By keeping in view these alterations, one can envisage the complementary therapies with antioxidants, including vitamins that might protect the organism against the production of free radicals and the decrease in antioxidant capacity. Such treatments may be beneficial in women at risk of GDM.

REFERENCES

- Gabbe S. Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1986;315:1025–6.
- Djrolo F, Megnigbeto Obey A, De Souza J, Takpara I, Santos P, et al. Influence of maternal weight on pregnancy outcome in Cotonou (Benin). *J Gynecol Biol Reprod* 2002;31:243–7.
- Khrouf N, Tabka Z, Becher SB, Miled SB, Hamza B. Fetal macrosomia and the study of risk factors in maternal diabetes. *Arch Fr Pediatr* 1983;40:815–7.
- Coustan DR. Gestational diabetes: a continuum of risk. *Eur J Endocrinol* 1997;137:13–4.
- Hunter DJS, Keirse MJNC. Gestational diabetes. In: Chalmers I, Enkin M, Keirse MJNC, eds. *Effective care in pregnancy and childbirth*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1989:403–10.
- Pettitt DJ, Nelson RG, Saad MF, Bennett PH, Knowler WC. Diabetes and obesity in the offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. *Diabetes Care* 1993;16:310–4.
- Silverman BL, Landsberg L, Metzger BE. Fetal hyperinsulinism offspring of diabetic mothers: association with the subsequent development of childhood obesity. *Ann NY Acad Sci* 1993;699:36–45.
- Hertel J, Kuhl C. Metabolic adaptation during the neonatal period in infants of diabetic mothers. *Acta Endocrinol* 1986;277:136–40.
- Ornoy A, Zaken V, Kohen R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzyme and low-molecular-weight antioxidant (LMWA) may be the causative factor increased anomalies. *Teratology* 1999;60:376–86.
- Yessoufou A, Moutairou K, Girard A, Fatoke M, Prost J, Ahissou H, et al. Antioxidant status in alcohol-related diabetes mellitus in Beninese subjects. *Cell Mol Biol* 2005;51:849–58.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18:872–9.
- Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria [review]. *Ann NY Acad Sci* 1999;884:19–40.
- Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:373–84.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci* 2000;899:136–47.
- Guemouri L, Artur Y, Herbeth B. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991;37:1932–7.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 1995;64:97–112.
- Zaman Z, Fielden P, Frost PG. Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin Chem* 1993;39:2229–34.
- Roe JH, Kuether CA. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 1943;147:399–407.
- Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel JY, et al. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2004;37:293–8.
- Quintanilha AT, Packer I, Szyszlo DJM, Racanelly TI, Davies KJA. Membrane effects of vitamin E deficiency bioenergetic and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria. *Ann NY Acad Sci* 1982;393:32–47.
- Blache D, Prost M. Free radical attack: biological test for human resistance capability. In: Ponnampertuna C, Gehrke CW, eds. *A lunar-based chemical analysis laboratory*. Hampton, VA: Deepak A, 1992:82–98.
- Caimi G, Carollo C, Lo Presti R. Diabetes mellitus: oxidative stress and wine. *Curr Med Res Opin* 2003;19:581–5.
- Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY, Prost J, et al. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetes subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 2003;22:15–27.
- Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990;39:1420–4.
- Yessoufou A, Soulaïmann N, Merzouk SA, Moutairou K, Ahissou H, Prost J, et al. N-3 Fatty acids modulate antioxidant status in rat and their macrosomic offspring. *Int J Obes* 2006;30:739–50.
- Merzouk H, Madani S, Hichami A, Prost J, Belleville J, Khan NA. Age related changes in fatty acids in obese offspring of streptozotocin-induced diabetic rats. *Obes Res* 2002;10:703–14.

27. Makimattila S, Lui ML, Wakkilainen J, Schlenzka A, Lahdempera S, Syvanne M, et al. Impaired epithelium-dependent vasodilatation in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:973–81.
28. Sundarm RK, Bhaskar A, Viljyaligam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundarm KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 1996;90:255–60.
29. Sinclair AJ. Free radical mechanisms and vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Rev* 1993;2:7–10.
30. Zaken V, Kohan R, Ornoy A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defence mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 2001;64:33–44.
31. Kajanachumpol S, Komindr S, Mahaisirivodom A. Plasma lipid peroxide and antioxidant levels in diabetic patients. *J Med Assoc Thai* 1997;80:372–7.
32. Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis [review]. *Vitam Horm* 2001;61:241–66.
33. Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I. Oxidant status in maternal and cord plasma tissue in gestational diabetes. *Placenta* 2006;27:327–32.
34. Chaudhari L, Tandon OP, Vaney N, Agarwal N. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetes. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003;47:441–6.
35. Merzouk H, Madani S, Prost J, Loukidi B, Meghelli-Bouchenak M, Belleville J. Changes in serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions at birth and after 1 month of life in macrosomic infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Eur J Pediatr* 1999;158:750–6.
36. Sekeroglu MR, Sahin H, Dulger H, Algun E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2000;33:669–74.
37. Uzel N, Sivas A, Uysal M, Oz H. Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metabol Res* 1987;19:89–90.
38. Dincer Y, Alademir Z, Ilkova II, Akcay T. Susceptibility of glutathione and glutathione-related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycaemia control. *Clin Biochem* 2002;35:297–301.
39. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001;34:65–70.
40. Ruiz C, Algeria A, Barbera A, Farre R, Lagarde MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type I diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:99–105.
41. Telci A, Cakatav U, Salman S, Satman I, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50:213–23.
42. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158–69.
43. Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Kowalska I, Kretowski A, Zarzycki W, et al. Lipid peroxidation, antioxidant defence and acid-base status in cord blood at birth: the influence of diabetes. *Horm Metab Res* 2001;33:227–31.
44. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Nightingale P, Kendall MJ, Brydon P, et al. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci* 2004;106:93–8.
45. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Ghio A, Giovannitti MG, et al. Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. *Diabet Med* 2005;22:21–5.
46. Orhan H, Onderoglu L, Yucel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2003;267:189–95.
47. Rajdl D, Racek J, Steinerova A, Novotny Z, Stozicky F, Trefil L, et al. Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. *Physiol Res* 2005;54:429–36.
48. Bis-Gluchowska M, Marciniak B, Szpringer-Bogun E, Rola R, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Determination of antioxidative-peroxidative balance in the cord blood of newborns delivered to mothers with diabetes type G1. *Ginekol Pol* 2001;72:1255–8.
49. Mazzanti L, Nanetti L, Vignini A, Rabini RA, Grechi G, Cester N, et al. Gestational diabetes affects platelet behaviour through modified oxidative radical metabolism. *Diabet Med* 2004;21:68–72.

Translational Research 2007

Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and their macrosomic offspring

Oussama Grissa¹, Jean-Marc Atègbo^{2,3}, Akadiri Yessoufou^{2,4}, Zouheir Tabka¹, Abdelhedi Miled⁵, Mehdi Jerbi⁶, Karim L. Dramane³, Josiane Prost², Kabirou Moutairou⁴, Aziz Hichami², NaiAkhtar Khan²

¹Department of Physiology and Functional Explorations, Farhat Hached University Hospital, 4000 Sousse, Tunisia; ²University of Burgundy, UPRES EA 4183 ‘‘Lipids and Cellular Signalling’’, Faculty of Life Sciences, 6, Boulevard Gabriel, Dijon 21000, France; ³Laboratory of Animal Physiology; ⁴Laboratory of Cell Biology and Physiology, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin; ⁵Department of Biochemistry; ⁶Department of Gynaecology, Farhat Hached University Hospital 4000 Sousse, Tunisia.

Résumé :

Le stress oxydatif est l'une des complications associées au diabète gestationnel et à la macrosomie. Dans cette étude, nous avons évalué le profil du statut antioxydant et des lipides circulants chez des mères diabétiques et leurs bébés macrosomiques par rapport aux mères contrôles et leurs progénitures. Le statut antioxydant a été évalué à travers la mesure de la résistance anti-radicalaire des hématies par le kit KRL[®], l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et les concentrations sériques des vitamines A, C et E. Les lipides circulants ont été quantifiés et la peroxydation lipidique a été mesurée à travers les concentrations sériques des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Comparées aux mères contrôles, les mères diabétiques ont montré des valeurs faibles en vitamine E et des concentrations élevées en vitamine C, sans changement de la concentration en vitamine A. Exceptée la vitamine E dont les concentrations étaient plus faibles chez les bébés macrosomiques que chez les contrôles, les concentrations des vitamines A et C n'étaient pas significativement différentes. Le diabète gestationnel et la macrosomie sont aussi associés à une diminution de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) et une augmentation des concentrations des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Globalement, le statut antioxydant total des mères diabétiques et de leurs bébés macrosomiques avait diminué par rapport aux sujets témoins. Les concentrations sériques en triglycérides et en cholestérol ne sont pas significativement différentes entre les mères diabétiques et les mères témoins ; toutefois, la macrosomie est associée à une augmentation des concentrations en cholestérol et en

triglycérides. Ces résultats suggèrent que le diabète gestationnel humain et la macrosomie sont associés à une baisse du statut antioxydant; de plus, les bébés macrosomiques présentent un métabolisme lipidique altéré.

Mots clés: Macrosomie; diabète gestationnel; stress oxydatif; vitamines.

*Growth factor concentrations and
their placental mRNA expression
are modulated in gestational diabetes mellitus :
possible interactions with macrosomia*

Publication n°3

Publication n°3

Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus: possible interactions with macrosomia

O. Grissa, A. Yessoufou, I. Mrisak, A. Hichami, D. Amoussou-Guenou, A. Grissa, F. Djrolo, K. Moutairou, A. Miled, H. Khairi, M. Zaouali, I. Bougmiza, A. Zbidi, Z. Tabka and N. A. Khan.

BioMed Central Pregnancy and Childbirth 2009

Objectif de l'étude

Plusieurs études ont démontré l'importance des facteurs de croissance dans la croissance fœtale chez les sujets obèses et diabétiques de type 2. Le but de ce travail est d'étudier l'implication des facteurs de croissance et leurs récepteurs dans le DGM et la macrosomie, et pour discuter du rôle de l'axe materno-foeto-placentaire dans la régulation de la croissance fœtale *in utero*.

Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus : possible interactions with macrosomia

Authors:

Oussama Grissa^{1,2}, Akadiri Yessoufou^{1,3}, Inès Mrisak², Aziz Hichami¹, Daniel Amoussou-Guenou⁴, Abir Grissa², François Djrolo⁴, Kabir Moutairou³, Abdelhedi Miled⁵, Hédi Khairi⁶, Monia Zaouali², Iheb Bougmiza⁷, Aabdelkarim Zbidi², Zouheir Tabka² and Naim A Khan*¹

Address: ¹University of Burgundy, UPRES EA4183 Lipids and Cell Signaling, Faculty of Life Sciences, Dijon, France; ²Department of Physiology and Functional Exploration, University Hospital Farhat Hached 4000 Sousse, Tunisia; ³Laboratory of Cell Biology and Physiology (ISBA/FAST), University of Abomey-Calavi, Bénin; ⁴Médecine Interne, Service d'Endocrinologie, Centre National Hospitalier et Universitaire (CNHU) de Cotonou, Faculté des Sciences de la Santé, University of Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin; ⁵Department of Biochemistry, ⁶Department of Gynaecology, University Hospital Farhat Hached 4000 Sousse; ⁷Department of Community Medicine, University Hospital Farhat Hached 4000 Sousse, Tunisia.

***Corresponding Author:**

ABSTRACT

Background:

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a form of diabetes that occurs during pregnancy. GDM is a well known risk factor for foetal overgrowth, termed macrosomia which is influenced by maternal hyperglycemia and endocrine status through placental circulation. The study was undertaken to investigate the implication of growth factors and their receptors in GDM and macrosomia, and to discuss the role of the materno-foeto-placental axis in the *in-utero* regulation of foetal growth.

Methods:

30 women with GDM and their 30 macrosomic babies (4.75 ± 0.15 kg), and 30 healthy age-matched pregnant women and their 30 newborns (3.50 ± 0.10 kg) were recruited in the present study. Serum concentrations of GH and growth factors, *i.e.*, IGF-I, IGF-BP3, FGF-2, EGF and PDGF-B were determined by ELISA. The expression of mRNA encoding for GH, IGF-I, IGF-BP3, FGF-2, PDGF-B and EGF, and their receptors, *i.e.*, GHR, IGF-IR, FGF-2R, EGFR and PDGFR- β were quantified by using RT-qPCR.

Results:

The serum concentrations of IGF-I, IGF-BP3, EGF, FGF-2 and PDGF-B were higher in GDM women and their macrosomic babies as compared to their respective controls. The placental mRNA expression of the growth factors was either upregulated (FGF-2 or PDGF-B) or remained unaltered (IGF-I and EGF) in the placenta of GDM women. The mRNA expression of three growth factor receptors, *i.e.*, IGF-IR, EGFR and PDGFR- β , was upregulated in the placenta of GDM women. Interestingly, serum concentrations of GH were downregulated in the GDM women and their macrosomic offspring. Besides, the expression of mRNAs encoding for GHR was higher, but that encoding for GH was lower, in the placenta of GDM women than control women.

Conclusions:

Our results demonstrate that growth factors might be implicated in GDM and, in part, in the pathology of macrosomia via materno-foeto-placental axis.

Background:

Excessive birth weight or foetal macrosomia is a common complication of gestational diabetes mellitus (GDM) and is associated with adverse maternal and infantile outcomes including higher rates of postpartum haemorrhage in mothers, perineal lacerations and increased risk for cesarean delivery [1]. Macrosomia has been defined as a birth weight above either 4 kg or 95th percentile for the gestational age. These infants are at greater risk for foetal asphyxia, shoulder dystocia, birth trauma and neonatal hypoglycemia. Furthermore, macrosomic babies may have an increased susceptibility to obesity and diabetes and/or cardiovascular diseases in the later stage of life [2].

Foetal growth is governed by interactions of genetic, nutritional, hormonal and environmental factors [3]. We have previously shown that the metabolism of lipids/lipoproteins [4,5] and antioxidant status [6,7] are altered in macrosomic newborns and their GDM mothers. We have shown the malfunctioning of T-cells [8,9] and high secretion of adipokines in GDM and their macrosomic infants [10]. Hence, we have hypothesized that the accelerated foetal growth, seen in the infants of GDM mothers, may be due to *in utero* programming, caused by a perturbation in the materno-foeto-placental growth axis [9]. Indeed, the *in utero* insulin concentrations have been shown to influence the induction and activity of various hepatic enzymes associated with fat and carbohydrate metabolism [11]. The role of growth factors has also been suggested in the macrosomia [12]. Roth et al. [13] have documented increased levels of IGF-1 in the cord blood of macrosomic infants born to GDM mothers. Lauszus et al. [14] studied diabetic pregnancy and noted that both IGF-1 and IGF-2 levels were correlated with high birth weight. It is noteworthy that the placenta is an important endocrine organ as, during human pregnancy, it produces numerous hormones which may promote early embryonic growth, [15] and influences the fetus by stimulating the production of IGF-I and insulin [16].

Keeping in view the role of insulin and growth factors in the progression of GDM and macrosomia [17], we further studied, in the present report, the materno-foeto-placental axis by determining the concentrations of several growth factors both in GDM mothers and their macrosomic newborns, and by assessing the expression of mRNA encoding for growth factors (GH, IGF-I, FGF-2, PDGF-B and EGF) and their receptors in the placentas of normal and GDM mothers.

Methods

Patients

The subjects were recruited in the Gynaecology Department, Hôpital Universitaire Farhat Hached, Tunisia, between February and August 2007. The study protocol was approved by the Sousse Farhat Hached Hospital Committee for Research on Human Subjects (Tunisia). Informed written consent was obtained from all the subjects/mothers. The pregnant women were 19 to 42 years old. Placentas and cord blood were collected in 60 deliveries divided into 30 GDM pregnancies, which had 30 macrosomic babies, and 30 control non-diabetic mothers, which had 30 normal newborns. Spontaneously vaginally delivered newborns, were immediately weighed after delivery. Babies from GDM mothers, whose birth weight was 2 S.D. greater than the mean birth weight of the control infants, were considered as macrosomic infants. Selected control women had no significant history of illness, no pregnancy-related complications and no risk factor for gestational diabetes including normal glucose tolerance tests during the first and third trimesters of pregnancy. GDM was diagnosis when fasting glucose ≥ 5.5 mmol/l. The severity of GDM was categorized according to the fasting plasma glucose level on the 3-hour 100-gr oral glucose tolerance test (OGTT).

Anthropometric parameters

Birth weight (BW) and length (BL) were obtained from each neonate immediately after birth. BL and head circumferences were measured with plastic-covered fabric measuring tapes and read to the nearest mm. Based on birth length, the ponderal index was calculated as : birth weight (g)/birth length³ (cm) x 100. The BMI was calculated as birth weight (Kg)/ birth length² (m). The biochemical characteristics of mothers and newborns are shown in Table 1.

Blood sample collection

From each patient or control subject, maternal blood was collected from arm vein after delivery of the baby but before placenta delivery. Cord blood samples were obtained from the umbilical vein immediately after delivery. Fasting venous blood samples were collected in tubes containing or not EDTA to obtain plasma and serum, respectively. Serum or plasma was obtained by centrifugation (1000g x 20 min). Plasma was immediately used for glucose and HbA1c determinations. Serum was aliquoted and frozen at -80°C for further determinations of insulin, GH, IGF-I, IGF-BP3, FGF-2, EGF and PDGF-B concentrations by ELISA (Peprotech Paris, France). Lipid levels were determined by using enzymatic methods, according to the instructions furnished with the kit (Boehringer, Mannheim, Germany).

Determination of insulin, GH and growth factor concentrations

Serum concentrations of insulin, GH, IGF-I and IGF-BP3 were estimated using non-extraction IRMA Kit (DSL Texas, USA). Serum concentrations of FGF-2, EGF and PDGF-B were estimated using ELISA Immunotech Kit (Peprotech Paris, France).

Determination of plasma glucose, HbA1c and apolipoprotein levels

Serum triglycerides, total cholesterol and uric acid levels were determined by using enzymatic methods. Plasma fasting glucose was determined by glucose oxidase method using glucose analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). Apolipoproteins A1 and B were determined by using spectrophotometer.

Detection of mRNA of GH, growth factors and their receptors by quantitative RT-PCR

Using RT-qPCR, we evaluated the expression of mRNA of growth hormone (GH), growth factors and their receptors, *e.g.*, insulin-like growth factor-I (IGF-I); IGF-I receptor (IGF-IR); fibroblast growth factor-2 (FGF-2); FGF-2 receptor (FGF-2R); platelet-derived growth factor-B (PDGF-B); PDGF receptor- β (PDGFR- β); epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor (EGFR) and IGF binding protein-3 (IGF-BP3).

Only one placental tissue from each subject was taken, washed and rinsed in sterile PBS, and immediately plunged into liquid nitrogen and stored at -80°C until the extraction of total RNA. Total RNA was extracted from placental tissue by using Trizol. One μg of total RNA was reverse transcribed with Super script II RNase H-reverse transcriptase. Real-time PCR was performed on the iCycler iQ real time detection system and amplification was undertaken by using SYBER Green I detection. Oligonucleotide primers, used for mRNA analysis, were based on the sequences of human genes in Gene bank database. The sequences of the PCR primers used are as follows: FGF-2, forward, 5'-CATACAGCAGCAGCCTAGCAAC-3' and reverse, 5'-TTCGGCAACAGCACACAAATCC-3'; EGF, forward, 5'-TCTGCGTGGTGGTGCTTGTC-3' and reverse, 5'-CCTGCGACTCCTCACATC TCTG -3'; PDGF-B, forward, 5'-CAAGACGGCACTGAAGGAGACC-3' and reverse, 5'-GAGACA GACGGACGAGGGAAAC-3'; EGFR, forward, 5'-GAGGGTGAGCCAAGGGAGTTTG-3' and reverse, 5'-GGCAGGTCTTGACGCAGTGG-3'; IGF-1, forward, 5'-CACCATGTCTCCTCGCAT CTC-3' and reverse, 5'-CCGACTGCTGGAGCCATAACC-3'; IGF-BP3, forward, 5'-GGTCCCTGCC GTAGAGAAATGG-3' and reverse, 5'-CCCCGCTTCTGCCTTTGG-3'; PDGF β -R, forward, 5'-C GCAGCAGTGAGAAGCAAGC-3' and reverse, 5'-TAGTCCACCAGGTCTCCGTAGC-3'; IGF-1R, forward, 5'-GCCTTGGTCTCCTTGTCTTCC-3' and reverse, 5'-GTTGCGGTGGTCCCAGTCC-3';

GH, forward, 5'-CCGACACCCTCCAACAGGGA-3' and reverse, 5'-CCTTGTCCATGTCCTTCCTG-3'; GHR, forward, 5'-GGTGAAGGATGGCGACTCTGG-3' and reverse, 5'-TGGATAACACTGGGC TGCTGAG-3'; FGF-2R, forward, 5'-CCCACCGCAGGCTGAAGG-3' and reverse, 5'-CACGACCA GGCAGATGAAACG-3'. Relative quantification of mRNA in different groups was determined as follows: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ of gene of interest - ΔCt of 18 S. $\Delta Ct = Ct$ of Macrosomic - Ct of control. Relative quantity (RQ) was calculated as follows: $RQ = (1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$.

Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance of the differences between groups was performed by one-way ANOVA, followed by LSD test. Differences with $p < 0.05$ were considered to be significant. Simple correlations were assessed by Spearman's rank test.

Multiple regression analysis was carried out by using SPSS (version 15). The dependent variable (BW = birth weight) was normally distributed. Pearson correlation coefficients (r) were determined by the associations between BW and growth factors [PDGF, IGF-BP3, FGF-2, EGF, GH and IGF-1]. A linear regression model was used to evaluate the independent variables explaining the variations in BW. Candidate variables were stepped into the model with a stepwise selection method. To determine entry and removal from the model, significant levels of 0.15 and 0.05 were used, respectively. BW reference equation was evaluated in two groups of 60 gestational mothers, diabetics or not and their new born babies, macrosomic or not.

RESULTS

Blood HbA1c, insulin and glucose levels

Plasma HbA1c levels were statistically higher in GDM women than control mothers (Table 1). GDM exhibited higher fasting glycemia and insulinemia compared with healthy pregnant mothers. The macrosomic babies, as well as their age matched controls, were normoglycemic, but the formers were hyperinsulinemic (Table 1).

Serum biochemical parameters

Triglyceride (TG) levels were higher in GDM mothers compared to the control women. HDL-, LDL- and total-cholesterol were not altered in macrosomic infants and their mothers compared to respective control subjects (Table 1). Serum protein and alanine aminotransferase levels were decreased whereas uric acid concentrations increased in GDM mothers. CRP and apolipoprotein A1 and B remained unchanged in GDM women and macrosomic babies compared to their respective controls. Serum protein and alanine aminotransferase levels were decreased whereas uric acid concentrations increased in GDM mothers. In fact, a concomitant increase in uric acid, alanine aminotransferase and protein concentrations indicates a situation of pre-eclampsia. Since protein concentrations were lower in GDM subjects, it indicated that there was no renal complication in these subjects.

Anthropometric Data

There were 14 males and 16 females among control neonates and 18 males and 12 females among macrosomic babies. BW, BL, HC and CP were, respectively, 3.50 ± 0.10 Kg, 49.00 ± 0.32 cm, 13.44 ± 0.30 (Kg/m^2), and 34.17 ± 0.21 cm in control neonates ; and 4.75 ± 0.15 Kg, 52.22 ± 0.31 cm, 35.80 ± 0.70 (Kg/m^2) and 35.87 ± 0.29 cm in macrosomic babies. Macrosomic neonates had significantly greater BW and BL than control neonates.

Serum growth factor concentrations and expression of mRNA of growth factor receptors:

As compared with non-diabetic mothers and their children, GDM women and their macrosomic newborns exhibited higher serum IGF-I levels. However, no difference was observed in placental IGF-I mRNA expression in GDM, although a significant increases was noticed in placental IGF-IR mRNA expression in these women (Fig. 1). IGF-BP3 concentrations were upregulated in the serum of GDM women and their infants though IGF-BP3 mRNA expression was down-regulated in the placenta of GDM mothers (Fig. 2). The pituitary GH levels in GDM mothers and their macrosomic infants were

downregulated. Interestingly, the expression of mRNA encoding for the pituitary GH was downregulated and that for GHR was upregulated in the placenta of GDM women (Fig. 3). Serum EGF levels both in GDM mothers and their macrosomic infants were upregulated though placental EGF mRNA expression remained unaltered in the GDM (Fig. 4). Placental EGFR mRNA expression was higher in GDM mothers than the control women (Fig. 4). Serum FGF-2 levels both in GDM and their macrosomic infants were upregulated as compared to respective controls. FGF-2 mRNA expression was upregulated whereas that of FGF-2R was downregulated in the placenta of GDM (Fig. 5). PDGF-B concentrations and the expression of mRNA for PDGF-B and its receptor, PDGFR- β , were higher in GDM and their macrosomic babies compared to respective controls (Fig. 6).

In this study, we have proposed a model for multiple regression model (Table 2) for the birth weight (BW) and different growth factors. Hence, Table 3 shows the correlation analysis.

DISCUSSION

An increased rate of foetal growth leading to macrosomia is the main abnormality in the infants born to GDM mothers [18]. In the present study, the GDM women were hyperinsulinemic and hyperglycemic, reflecting a decrease in insulin sensitivity in these individuals [19]. However, the macrosomic infants were only hyperinsulinemic. Indeed, it has been shown that during GDM, the mother's glucose, after its passage via the foeto-placental barrier, induces the release of insulin from foetal pancreas and, thereby, produces foetal hyperinsulinemia [19]. Hence, the increased levels of foetal insulin have been shown to stimulate mitogenic and anabolic mechanisms in the insulin sensitive foetal tissues, *i.e.*, muscle, connective tissue and adipose tissue.

Recent studies have documented that, in addition to insulin, a variety of maternal and foetal insulin-like growth factors (IGF) may play an important role in the foetal growth [20]. The protocol of the present study did not allow us to discriminate into which compartment placentally produced hormones were secreted. However, we observed that serum IGF-I levels in macrosomic newborns and their GDM mothers were higher than those in controls. Our observations corroborate several reports which have demonstrated increased levels of IGF-I during pregnancy in both the maternal and foetal serum; hence, the upregulated IGF-I concentrations were correlated with the infant's birth weight [20,21,22]. In contrast, Hill et al. [23] have demonstrated no significant alterations in the levels of cord blood IGF-I of GDM mothers compared to the control. Interestingly, the expression of IGF-I mRNA is not significantly altered in the placenta of GDM mothers. In fact, Roth et al. [13] have demonstrated no differences in the expression of IGF-I mRNA in the placentas of GDM and control mothers. IGF-I cannot cross the placental barrier [24] and, hence, it is unlikely that the increase in the foetal size may be due to high maternal IGF-I levels. Though the origin of IGF-I in macrosomic babies is not well understood, high levels of foetal IGF-I may be implicated in the weight gain in the macrosomic babies [25].

The effect of delivery upon circulating hormone levels in general is unknown. In mother with GDM, IGF-I levels were significant correlated with IGF-I levels in macrosomic newborns ($r=0.52$, $n= 30$, $P=0.017$). Additionally, IGF-I might also influence the transport of glucose and amino acids across the placenta [25, 26] and might again contribute to weight gain in macrosomic infants. Furthermore, the increased expression of IGF-IR mRNA in the placenta will also facilitate the mechanism of action of IGF-I in macrosomic babies. Our idea can be supported by the observations of Bhaumick et al. [27] who have reported a high placental number of IGF-IR during diabetic pregnancy. Hence, increased numbers of placental IGF-IR were supposed to be induced by the poor glycemic control as observed in the GDM women in our study [27].

Primarily, IGF-1 is regulated by the IGF-BP3, an IGF-I binding protein. The IGF-BP3 complexes with IGF-I and, therefore, acts as a reservoir for IGF-I in the blood circulation [28]. We have observed that IGF-BP3 levels are increased in the serum of GDM mothers and their macrosomic infants and IGF-I levels were significant correlated with IGF-BP3 in macrosomic newborns ($r=0.36$, $n= 30$, $P=0.04$). Our observations are in close agreement with the results of several investigators [29] who have demonstrated an increase in cord serum IGF-BP3 concentrations in GDM pregnancies, though Hill et al [23] have observed no significant modifications in the levels of IGF-BP3 of GDM mothers and their babies. In our study, the high levels of IGF-BP3 in GDM and their macrosomic infants are not contributed by the placenta as the IGF-BP3 mRNA expression is downregulated in GDM women. Hence, it is possible that high insulin and IGF-I concentrations both in GDM mothers and macrosomic babies might be responsible for high IGF-BP3 synthesis. Indeed, insulin has been shown to regulate IGF-BP3 levels in GDM pregnancy [30]. Moreover, insulin and IGF-I treatment *in vitro* also stimulates the secretion of IGF-BP3 [31].

Regarding GH, we would like to stress that placental GH constitutes the majority of circulating growth hormone in late pregnancy, and this hormone is not found in the fetal circulation. In our study, we observed that pituitary GH levels were significantly diminished in the GDM women and their macrosomic infants. Similarly, pituitary GH mRNA expression is also curtailed in the placenta of these women, though placental pituitary GHR mRNA is upregulated in these subjects. We would like to recall that pituitary GH levels are diminished gradually as a function of progress of a normal pregnancy [32]. It is noteworthy that placenta expresses another variant of GH (GHv) which bears a close homology with pituitary GH. Hence, we cannot elaborate the role of GHv. In our study, the PCR primers used for the GH could not distinguish between these two variants of GH. However, it is clear that they share 93% of amino acid sequences. Interestingly, in mother with GDM, pituitary GH levels were significant correlated with macrosomic birth weight babies ($r=0.36$, $n= 30$, $P=0.04$). How pituitary GH concentration in GDM and macrosomic babies are downregulated is not well understood. However, Lee et al. [33] have shown that insulin resistance, marked by high plasmatic insulin concentrations, is associated with low GH levels in diabetic subjects. It is possible that high IGF-I levels may be responsible for low GH concentrations in the GDM women and macrosomic babies. Our statement is supported by the observations of Lacroix et al. [34] who have demonstrated that placental exposure to high IGF-I levels could induce a down-regulation of pituitary GH production in the sheep. Besides, Misra et al. [35] have recently shown that low GH levels are involved in weight gain.

EGF has been shown to modulate foeto-placental growth regulation [34,36]. We observed that EGF concentrations were increased in GDM mothers and macrosomic babies though the placental EGF mRNA was not altered. Our results are in accordance with the report of Loukovaara et al. [37] who have

shown that cord serum EGF concentrations are increased in GDM pregnancies. Since EGF-R mRNA expression is higher in the placenta of GDM women than that in control women, we can allude that high availability of these receptors in the presence of high EGF concentrations may be involved in the weight gain in the macrosomic babies. Hence, we would like to cite the results of Masuyama et al. [38] who have illustrated that EGF promotes amino acid transport in the rat placenta and, therefore, influences foetal growth. EGF has been reported not to cross the placental barrier [39]. How EGF concentrations are increased in GDM is not well-understood. However, it has been hypothesized that a rise in EGF levels seems to be a metabolic response of the foeto-placental unit to diabetes-related hyperglycemia [37]. In mother with GDM, glucose levels were significant correlated with EGF levels ($r=-0.57$, $n=30$, $P=0.027$) and with newborns EGF levels ($r=-0.51$, $n=30$, $P=0.031$).

In our study, we observed higher FGF-2 concentrations in GDM mothers and their macrosomic infants than their respective controls. Furthermore, in the placenta of GDM women, we noticed a high expression of FGF-2 mRNA which may contribute to high FGF-2 synthesis. Our observations are substantiated by the report of Hill et al. [40] who have shown the placenta to be the site of FGF-2 synthesis. FGF-2, widely expressed by embryonic tissues [41], is associated to increased incidence of foetal macrosomia [42]. Whatsoever, the FGF-2R mRNA expression is downregulated in the placenta. Platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors (PDGFR) are important regulators for tissue interactions to cell migration, proliferation, survival and deposition of extracellular matrix during mammalian embryonic development [43]. Three ligands (PDGF-A, -B, and -C) bind to PDGFR- α with high affinity. To date, studies suggest that PDGF-B and PDGF-D mainly bind to PDGFR- β which is implicated in the organogenesis, whereas PDGF-A binds to PDGFR- α which is required for embryogenesis [43]. PDGF-C binds to both PDGFR- α and PDGFR- β and has limited role in the development of the foetus [43]. Since PDGF-B and PDGFR- β are also essential for development of normal structure and function of conduit vessels and capillaries, [44] we, in the present study, focused our study on these two parameters. Hence, we observed a significant rise in the mRNA expression of PDGF-B and PDGFR- β in the placenta of GDM mothers compared with controls. Plasma PDGF-B concentrations were also increased in GDM mothers and their macrosomic infants. The macrosomic birth weight were significant correlated with the plasma PDGF-B levels ($r=-0.45$, $n=30$, $P=0.049$). Such an increase in PDGF-B production in gestational myometrium could be associated with the uterine smooth muscle cell hyperplasia and hypertrophy, characteristics of the gestational uterus. Our results are in accordance with those obtained by Heiring et al. [45] who have observed a significantly stronger PDGFR mRNA in pregnant women with GDM compared with normal pregnant women. As far as the physiological inductor of PDGFR- β levels is concerned, we would like to mention the implication of

shown that cord serum EGF concentrations are increased in GDM pregnancies. Since EGF-R mRNA expression is higher in the placenta of GDM women than that in control women, we can allude that high availability of these receptors in the presence of high EGF concentrations may be involved in the weight gain in the macrosomic babies. Hence, we would like to cite the results of Masuyama et al. [38] who have illustrated that EGF promotes amino acid transport in the rat placenta and, therefore, influences foetal growth. EGF has been reported not to cross the placental barrier [39]. How EGF concentrations are increased in GDM is not well-understood. However, it has been hypothesized that a rise in EGF levels seems to be a metabolic response of the foeto-placental unit to diabetes-related hyperglycemia [37]. In mother with GDM, glucose levels were significant correlated with EGF levels ($r=-0.57$, $n=30$, $P=0.027$) and with newborns EGF levels ($r=-0.51$, $n=30$, $P=0.031$).

In our study, we observed higher FGF-2 concentrations in GDM mothers and their macrosomic infants than their respective controls. Furthermore, in the placenta of GDM women, we noticed a high expression of FGF-2 mRNA which may contribute to high FGF-2 synthesis. Our observations are substantiated by the report of Hill et al. [40] who have shown the placenta to be the site of FGF-2 synthesis. FGF-2, widely expressed by embryonic tissues [41], is associated to increased incidence of foetal macrosomia [42]. Whatsoever, the FGF-2R mRNA expression is downregulated in the placenta. Platelet-derived growth factor (PDGF) and its receptors (PDGFR) are important regulators for tissue interactions to cell migration, proliferation, survival and deposition of extracellular matrix during mammalian embryonic development [43]. Three ligands (PDGF-A, -B, and -C) bind to PDGFR- α with high affinity. To date, studies suggest that PDGF-B and PDGF-D mainly bind to PDGFR- β which is implicated in the organogenesis, whereas PDGF-A binds to PDGFR- α which is required for embryogenesis [43]. PDGF-C binds to both PDGFR- α and PDGFR- β and has limited role in the development of the foetus [43]. Since PDGF-B and PDGFR- β are also essential for development of normal structure and function of conduit vessels and capillaries, [44] we, in the present study, focused our study on these two parameters. Hence, we observed a significant rise in the mRNA expression of PDGF-B and PDGFR- β in the placenta of GDM mothers compared with controls. Plasma PDGF-B concentrations were also increased in GDM mothers and their macrosomic infants. The macrosomic birth weight were significant correlated with the plasma PDGF-B levels ($r=-0.45$, $n=30$, $P=0.049$). Such an increase in PDGF-B production in gestational myometrium could be associated with the uterine smooth muscle cell hyperplasia and hypertrophy, characteristics of the gestational uterus. Our results are in accordance with those obtained by Heiring et al. [45] who have observed a significantly stronger PDGFR mRNA in pregnant women with GDM compared with normal pregnant women. As far as the physiological inductor of PDGFR- β levels is concerned, we would like to mention the implication of

insulin. The level of insulin in macrosomic newborns, were significant correlated with the plasma PDGF-B levels ($r=0.53$, $n=30$, $P=0.017$). Indeed, insulin has been shown to enhance the mitogenic effects of PDGFR- β in cultured smooth muscle cells where it interferes with the cell signaling cascade, particularly with phosphatidylinositol-3-kinase of PDGFR- β [46, 47]. High PDGF-B levels via PDGFR- β may also participate in placental angiogenesis in GDM women [48]. To properly interpret our results, we tried to present a linear regression model that summarizes all interactions between the different growth factors studied: $BW (g) = 5,041 \times PDGF-M 2743 + x FGF2-M 7673 + x FGF2-NB - 1264$. Hence, the main factors that affect fetal weight are maternal PDGF, and maternal and fetal FGF2 (Table 3).

CONCLUSION

A perusal of our observations suggests that human GDM and macrosomia are associated with down-regulation of GH and up-regulation of several growth factors, principally IGF-I, EGF, FGF-2 and PDGF-B. The mRNA expression of three growth factor receptors, *i.e.*, IGF-IR, EGF-R and PDGFR- β , was upregulated in the placenta of GDM women. It seems that growth factors and their receptors influence materno-foeto-placental communication which might be implicated in the foetal weight gain in macrosomic babies during hyperinsulinemia, apparently seen in the GDM and their infants. However, further studies are required to study the interaction of growth factors with their receptors and whether downstream signaling cascade is altered in the placenta or target organs of GDM and macrosomia.

Abbreviations: BMI, Body mass index; BW, Body weight; BL, Body length; CP, Cranial Parameter; GDM, Gestational Diabetes mellitus; EGF, Epidermal Growth factor; EGF-R, Epidermal growth factor receptor; FGF-2, Fibroblast growth factor-2; FGF-2R, Fibroblast growth factor-2 receptor; GDM, gestational diabetes mellitus; GH, Growth hormone; GHR, Growth hormone receptor; IGF-I, Insulin-like growth factor-I; IGF-IR, Insulin-like growth factor-I receptor; IGF-BP3, Insulin-like growth factor binding protein-3; Mac, macrosomic; PDGF-B, Platelet derived growth factor- β ; PDGFR- β , Platelet derived growth factor receptor; HbA1c, Hemoglobin glycoside or clique; LSD: least significant difference; RQ, Relative quantity; CRP, C-Reactive Protein; HDL, high density lipoprotein; LDL, Low density lipoprotein; TG, Triglyceride; BW, Birth Weight; OGTT, oral glucose tolerance test.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GO was in charge of the practical work and prepared major parts of the manuscript. AY and IM collected and analyzed data. AH contributed to the development of the protocol. DA-G, AG, FD and KM contributed to the collection of samples and the laboratory work. AM conducted biochemical analyses. HK participated in interpretation of the gynecology function. MZ carried out the immunoassays. AZ participated in the interpretation of the medical parameters. ZT and NAK planned and supervised the study and contributed to the revisions and the final drafts of the manuscripts.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We express our sincere thanks to the French institute cooperation for the sanction of a scholarship to one of the authors (OG). Our sincere thanks are due to Institut de Recherche pour le Développement (IRD) which sanctioned tripartite project CORUS2 for the present study. We would like to thank the Biochemistry Laboratory of Soussa Farhat Hached Hospital for their kind collaboration. We also express our sincere thanks to Mrs Salwa Jemni Yakoob and Mr Taher Chakroun “Unité de recherche, étude des fonctions plaquettaires (UR06SP05) centre régionale” for their precious help.

References

- [1]. Shen SJ, Wang CY, Nelson KK, Jansent M, Ilan J: **Expression of insulin-like growth factor II in human placentas from normal and diabetic pregnancies.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986, **83**:9179-9182.
- [2]. Silverman BL, Landsberg L, Metzger BE: **Foetal hyperinsulinism offspring of diabetic mothers: association with the subsequent development of childhood obesity.** *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1993, **699**:36-45.
- [3]. Ogilvy-Stuart AL, Hands SJ, Adcock CJ, Holly JM, Matthews DR, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Wilkinson AR, Dunger DB: **Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-1, growth hormone, and feeding in the newborn.** *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, **83**:3550-3557.
- [4]. Khan NA: **Role of lipids and fatty acids in macrosomic offspring of diabetic pregnancy.** *Cell Biochem Biophys.* 2007, **48**:79-88.
- [5]. Merzouk H, Khan NA: **Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects?** *Clin Sci.* 2003, **105**:519-529.
- [6]. Yessoufou A, Soulaïmann N, Merzouk SA, Moutairou K, Ahissou H, Prost J, Simonin AM, Merzouk H, Hichami A, Khan NA: **N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring.** *Int J Obes.* 2006, **30**:739-750.
- [7]. Grissa O, Atègbo JM, Yessoufou A, Tabka Z, Miled A, Jerbi M, Dramane KL, Moutairou K, Prost J, Hichami A, Khan NA: **Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia.** *Transl Res.* 2007, **150**:164-171.
- [8]. Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A: **N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia.** *J Autoimmun.* 2006, **26**:268-277.
- [9]. Khan NA: **Role of T-cells in diabetic pregnancy and macrosomia.** *Ind J Biochem Biophys.* 2007, **44**:344-409.

- [10]. Atègbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA: **Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, **91**:4137-4143.
- [11]. Fowden A L: **The role of insulin in prenatal growth.** *J Dev Physiol.* 1989, **12**:173-182.
- [12]. Lindsay RS, Westgate JA, Beattie J, Pattison NS, Gamble G, Mildenhall LF, Breier BH, Johnstone FD: **Inverse changes in fetal insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 in association with higher birth weight in maternal diabetes.** *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007, **66(3)**:322-328.
- [13]. Roth S, Abernathv MP, Lee WH, Pratt L, Denne S, Golichowski A, Pescovitz OH: **Insulin-like growth factor I and II peptide and messenger RNA levels in macrosomic infants of diabetic pregnancies.** *J Soc Gynecol Invest.* 1996, **3**:78-84
- [14]. Lauszus FF: **The clinical significance of IGF-I in maternal serum during pregnancy in type 1 diabetes.** *Curr Diabetes Rev.* 2007, **3**:194-197.
- [15]. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK: **Growth promoting effects of human placental lactogen during early organogenesis: a link to insulin-like growth factors.** *J Anat.* 2001, **198**:651–662.
- [16]. Handwerger S, Freemark M: **The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human foetal growth and development.** *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000, **13**:343–356.
- [17]. Westgate JA, Lindsay RS, Beattie J, Pattison NS, Gamble G, Mildenhall LF, Breier BH, Johnstone FD: **Hyperinsulinemia in cord blood in mothers with type 2 diabetes and gestational diabetes mellitus in New Zealand.** *Diabetes Care.* 2006, **29(6)**:1345-1350.
- [18]. Fee BA, Weil WB Jr: **Body composition of infants of diabetic mothers by direct analysis.** *Ann N Y Acad Sci.* 1963, **110**:869-897.

- [19]. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J: **Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus.** *J Nutr.* 2003, **133**:1674–1683.
- [20]. Zollers WG Jr, Babishkin JS, Pepe GJ, Albrecht ED: **Developmental regulation of placental insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein-I and -2 messenger RNA expression during primate pregnancy.** *Biol Reprod.* 2001, **4**:1208-1214.
- [21]. Roth S, Abernathv MP, Lee WH, Pratt L, Denne S, Golichowski A, Pescovitz OH: **Insulin-like growth factor I and II peptide and messenger RNA levels in macrosomic infants of diabetic pregnancies.** *J Soc Gynecol Invest.* 1996, **3**:78-84.
- [22]. Lauszus FF, Klebe JG, Flyvbjerg A: **Macrosomia associated with maternal serum insulin-like growth factor –I and II in diabetic pregnancy.** *Obstet Gyneco.* 2001, **197**:734-741.
- [23]. Hill WC, Pelle-Day G, Kitzmiller JL, Spencer EM: **Insulin-like growth factors in fetal macrosomia with and without maternal diabetes.** *Horm Res. Pediatr.* 1989, **32**:178-182.
- [24]. Davenport ML, Clemmons DR, Miles MV, Camacho-Hubner C, D'Ercole AJ, Underwood LE: **Regulation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during rat pregnancy.** *Endocrinology.* 1990, **127**:1278-1286.
- [25]. Ashton IK, Spencer EM: **Effect of partially purified human somatomedin on human foetal and postnatal cartilage in vitro.** *Early Hum Dev.* 1983, **8**:135–140.
- [26]. Kniss DA, Shubert PJ, Zimmerman PD, Landon MB, Gabbe SG: **Insulin like growth factors. Their regulation of glucose and amino acid transport in placental trophoblasts isolated from first trimester chorionic villi.** *J Reprod Med.* 1994, **39**:249–256.
- [27]. Bhaumick B, Danilkewich AD, Bala RM: **Altered placental insulin and insulin-like growth factor-I receptors in diabetes.** *Life Sci.* 1988, **42**:1603-1614.
- [28]. Lee PD, Conover CA, Powell DR: **Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1.** *Proc Soc Exp.* 1993, **204**:4–29.

- [29]. Yan-Jun L, Tsushima T, Minei S, Sanaka M, Nagashima T, Yanagisawa K, Omori Y: **Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins (IGFBP-1, -2 and -3) in diabetic pregnancy: relationship to macrosomia.** *Endocr J.* 1996, **43**:221-231.
- [30]. Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Fan J, Frost RA, Wilson TA: **Insulin- like growth factor binding protein-3 proteolysis in children with insulin-dependent diabetes mellitus: a possible role for insulin in the regulation of IGFBP-3 protease activity.** *J Clin Endocrinol Metab.* 1995, **80**:2282-2288.
- [31]. Kalme T, Loukovaara M, Koistinen H, Koistinen R, Seppälä M, Leinonen P: **Factors regulating insulin-like growth factor binding protein-3 secretion from human hepatoma (HepG2) cells.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001, **78**:131-135.
- [32]. Mirlesse V, Frankenne F, Alsat E, Poncelet M, Hennen G, Evain-Brion D: **Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation.** *Pediatr Res.* 1993, **34**:439–442.
- [33]. Lee ZS, Chan JC, Yeung VT, Chow CC, Lau MS, Ko GT, Li JK, Cockram CS and JA Critchley: **Plasma insulin, growth hormone, cortisol, and central obesity among young Chinese type 2 diabetic patients.** *Diabetes Care.* 1999, **22**:1450-1457.
- [34]. Lacroix MC, Devinoy E, Cassy S, Servely JL, Vidaud M, Kann G: **Expression of growth hormone and its receptor in the placental and foeto-maternal environment during early pregnancy in sheep.** *Endocrinology.* 1999, **140**:5587-5597.
- [35]. Misra M, Bredella MA, Tsai P, Mendes N, Miller KK, Klibanski A: **Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008, **295**:385-392.
- [36]. Gogg S, Smith U: **Epidermal growth factor and transforming growth factor mimic the effects of insulin in human fat cells and augment downstream signaling in insulin resistance.** *J Biol Chem.* 2002, **277**:36045–36051.

- [37]. Loukovaara M, Leinonen P, Teramo K, Andersson S, Alfthan H, Stenman UH: **Diabetic Pregnancy Associated With Increased Epidermal Growth Factor in Cord Serum at Term.** *Obstet Gynecol.* 2004, **240**:243–103.
- [38]. Masuyama H, Hiramatsu Y, Kudo T: **Effect of epidermal growth factor on placental amino acid transport and regulation of epidermal growth factor receptor expression of hepatocyte in rat.** *J Perinat Med.* 1996, **24**:213-220.
- [39]. Hofmann GE, Abramowicz JS: **Epidermal growth factor (EGF) concentrations in amniotic fluid and maternal urine during pregnancy.** *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1990, **69**:217-221.
- [40]. Hill DJ, Tevaarwerk GJ, Caddell C, Arany E, Kilkenny D, Gregory M: **Fibroblast growth factor 2 is elevated in term maternal and cord serum and amniotic fluid in pregnancies complicated by diabetes: relationship to foetal and placental size.** *J Clin Endocrinol Metab.* 1995, **80**:2626-2632.
- [41]. Amaya E, Musci TJ, Kirschner MW: **Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in ken opus embryos.** *Cell.* 1991, **66**:257-270.
- [42]. Hill DJ, Milner RDG: **Insulin as a growth factor.** *Pediatr Res.* 1985, **19**:879-886.
- [43]. Hoch RV, Soriano P: **Roles of PDGF in animal development.** *Development.* 2003, **130**:4769–4784.
- [44]. Nyström HC, Lindblom P, Wickman A, Andersson I, Norlin J, Fäldt J, Lindahl P, Skött O, Bjarnegård M, Fitzgerald SM, Caidahl K, Gan LM, Betsholtz C, Bergström G: **Platelet-derived growth factor B retention is essential for development of normal structure and function of conduit vessels and capillaries.** *Cardiovasc Res.* 2006, **71**:557-565.
- [45]. Heinig J, Wilhelm S, Müller H, Briese V, Bittorf T, Brock J: **Determination of cytokine mRNA-expression in term human placenta of patients with gestational hypertension, intrauterine growth retardation and gestational diabetes mellitus using polymerase chain reaction.** *Zentralbl Gynakol.* 2000, **122**:413-418.

- [46]. Dixit M, Zhuang D, Ceacareanu B, Hassid A: **Treatment with insulin uncovers the mitogenic capacity of nitric oxide in aortic smooth muscle cells: dependence on Gab1 and Gab1-SHP2 association.** *Circ Res.* 2003, **93**:113-123.
- [47]. Zhuang D, Pu Q, Ceacareanu B, Chang Y, Dixit M, Hassid A: **Chronic insulin treatment amplifies PDGF-induced motility in differentiated aortic smooth muscle cells by suppressing the expression and function of PTP1B.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008, **295**:163-173.
- [48]. Holmgren L, Glaser A, Pfeifer-Ohlsson S, Ohlsson R: **Angiogenesis during human extra embryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression.** *Development.* 1991, **113**:749-754.

Figure legends

FIG. 1. (a) Serum IGF-I concentrations, and (b) expression of placental mRNA of IGF-I and IGF-IR in gestational diabetic mothers and their babies. Serum IGF-I concentrations and mRNA expression by RT-PCR were assessed as described in the section of the methods. Values are means \pm SD. NS=insignificant differences. n=60 control mothers and babies; n=60 gestational diabetic mothers and macrosomic babies.

FIG. 2. (a) Serum IGF-BP3 concentrations and (b) expression of placental IGF-BP3 mRNA in gestational diabetic mothers and their babies. Serum IGF-BP3 concentrations and mRNA expression by RT-PCR were assessed as described in the section of the methods. Values are means \pm SD. n=60 control mothers and babies; n=60 gestational diabetic mothers and macrosomic babies.

FIG. 3. (a) Serum GH concentrations, and (b) expression of placental mRNA of GH and GHR in gestational diabetic mothers and their babies. Serum GH concentrations and mRNA expression by RT-PCR were assessed as described in the section of the methods. Values are means \pm SD. n=60 control mothers and babies; n=60 gestational diabetic mothers and macrosomic babies.

FIG. 4. (a) Serum EGF concentrations, and (b) expression of placental mRNA of EGF and EGFR in gestational diabetic mothers and their babies. Serum EGF concentrations and mRNA expression by RT-PCR were assessed as described in the section of the methods. Values are means \pm SD. NS=insignificant differences. n=60 control mothers and babies; n=60 gestational diabetic mothers and macrosomic babies.

FIG. 5. (a) Serum FGF-2 concentrations, and (b) expression of placental mRNA of FGF-2 and FGF-2R in gestational diabetic mothers and their babies. Serum FGF-2 concentrations and mRNA expression by RT-PCR were assessed as described in the section of the methods. Values are means \pm SD. n=60 control mothers and babies; n=60 gestational diabetic mothers and macrosomic babies.

FIG. 6. (a) Serum PDGF-B concentrations, and (b) expression of placental mRNA of PDGF-B and PDGFR- β in gestational diabetic mothers and their babies. Serum PDGF-B concentrations and mRNA expression by RT-PCR were assessed as described in the section of the methods. Values are means \pm SD. n=60 control mothers/babies; n=60 gestational diabetic mothers/macrosomic babies.

Table 1: Biochemical characteristics of mothers and their offspring

	Newborns		Mothers	
	Control	Macrosomic	Control	Diabetic
Insulinemia (μ UI/ml)	5.43 \pm 0.90	7.50 \pm 3.25*	4.99 \pm 1.20	10.55 \pm 4.80**
HbA1c (%)	-	-	4.0 \pm 0.50	6.9 \pm 0.45**
Fasting glucose (mmol/l)	5.89 \pm 0.80	4.96 \pm 0.40	4.57 \pm 0.77	6.80 \pm 0.66**
Apolipoprotein A1	1.21 \pm 0.06	1.17 \pm 0.1	2.01 \pm 0.29	1.91 \pm 0.26
Apolipoprotein B	0.56 \pm 0.08	0,4 \pm 0,05	1.31 \pm 0.25	1.23 \pm 0.09
CRP	1.7 \pm 0.33	1.74 \pm 0.63	4.60 \pm 0.8	5.75 \pm 1.42
Total cholesterol (mmol/l)	1.85 \pm 0.18	1.92 \pm 0.12	5.74 \pm 0.21	5.19 \pm 0.32
HDL-cholesterol (mmol/l)	0.83 \pm 0.06	0.92 \pm 0.06	2.25 \pm 0.16	2.20 \pm 0.12
LDL-cholesterol (mmol/l)	0.74 \pm 0.15	0.64 \pm 0.05	2.61 \pm 0.26	2.16 \pm 0.26
Triglycerides (mmol/l)	0.57 \pm 0.05	0.50 \pm 0.01	1.92 \pm 0.14	2.48 \pm 0.15*
Uric acid	283.86 \pm 16.85	305.93 \pm 19.29	257.92 \pm 15.66	326.45 \pm 29.39*
Proteins	49 \pm 1.40	51.38 \pm 1.67	58.60 \pm 0.95	55.50 \pm 1.44**
BMI (Kg/m^2)	13.44 \pm 0.30	35.80 \pm 0.70*	23.15 \pm 2.30	24.90 \pm 2.90
Aspartate aminotransferase (UI/l)	36.76 \pm 3.27	41.33 \pm 6.04	30.02 \pm 4.19	21.23 \pm 2.57
Alanine aminotransferase (UI/l)	12.67 \pm 1.49	11.85 \pm 2.10	16.45 \pm 2.5	8.25 \pm 1.49**
Mode of delivery	-	-	Spontaneous	Spontaneous

Values are means \pm SD. n=60 control mothers and babies; n=60 gestational diabetic mothers and macrosomic babies. Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls is as follow: *p < 0.05, **p < 0.001.

Table 2: Correlation between birth weight & growth factors

Correlation: birth weight & growth factor	n	r	P
PDGF-NB	60	0.476	0.025*
PDGF-M	60	0.486	0.021*
IGF-BP3-NB	60	0.636	0.01*
IGF-BP3-M	60	0.150	0.502
FGF-2-NB	60	0.626	0.01*
FGF-2-M	60	0.181	0.418
GH-NB	60	0.078	0.724
GH-M	60	0.310	0.159
EGF-NB	60	0.626	0.001**
EGF-M	60	0.181	0.418
IGF-1-NB	60	0.31	0.159
IGF-1-M	60	0.253	0.255

*p < 0.05, **p < 0.001, for abbreviations, see the Table 3.

Table 3: Independent variables included in the forward linear stepwise multiple regression model for the birth weight (BW)

VARIABLE	INITIAL MODEL				FINAL MODEL			
	95% confidence interval				95% confidence interval			
	Mean difference in birth weight (g)	Lower bound	Upper bound	P	Mean difference in birth weight (g)	Lower bound	Upper bound	P
Constant	- 1563	- 7199	4073	0.287	- 1264	- 3124	596	0.170
PDGF-NB	0.659	-3	5	0.594	-	-	-	-
PDGF-M	5.023	2	8	0.002	5.041	3	7	0
IGF-BP3-NB	-0.571	- 2	0	0.177	-	-	-	-
IGF-BP3-M	0.058	0	0	0.277	-	-	-	-
FGF-2-NB	-	-	-	0.074	7.673	5	10	0
FGF-2-M	3.321	- 1	8	0.029	2.743	0	6	0.057
GH-NB	25.320	- 24	75	0.161	-	-	-	-
GH-M	602	- 742	1945	0.100	-	-	-	-
EGF-NB	6.228	1	11	0.001	-	-	-	-
IGF-1-NB	-5.690	-3	2	0.781	-	-	-	-
IGF-1-M	0.466	- 1	2	0.619	-	-	-	-
Gender	366	-56	788	0.082	-	-	-	-

PDGF-NB : Platelet derived growth factor-New born, PDGF-M : Platelet derived growth factor-Mother, IGF-BP3-NB: Insulin-like growth factor binding protein-3 New born, IGF-BP3 M:Insulin-like growth factor binding protein-3 Mother, FGF-2 NB: Fibroblast growth factor-2 New born, FGF-2 M: Fibroblast growth factor-2 Mother, GH-NB: Growth hormone-New born, GH M : Growth hormone- Mother, EGF-NB: Epidermal growth factor-New born, IGF-1 NB: Insulin-like growth factor-I New born, IGF-1 M: Insulin-like growth factor-I-Mother, infant's gender (male/female). Proposed model for the total sample: $BW (g) = 5.041 \times PDGF-M + 2.743 \times FGF2-M + 7.673 \times FGF2-NB - 1264$. GH should be considered as pituitary-GH.

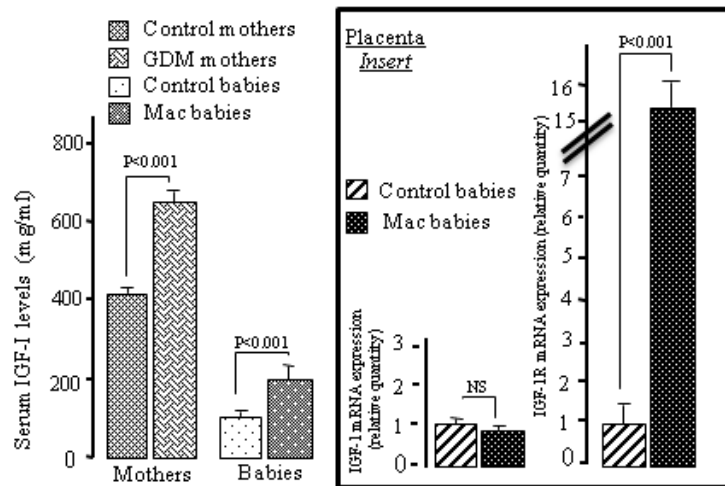
FIGURE 1

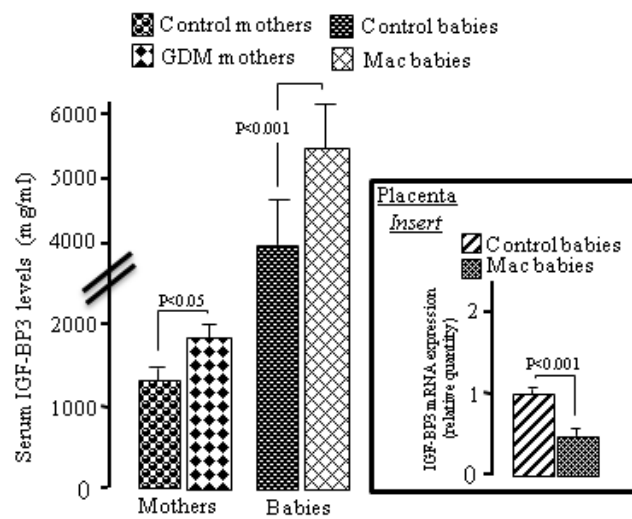
FIGURE 2

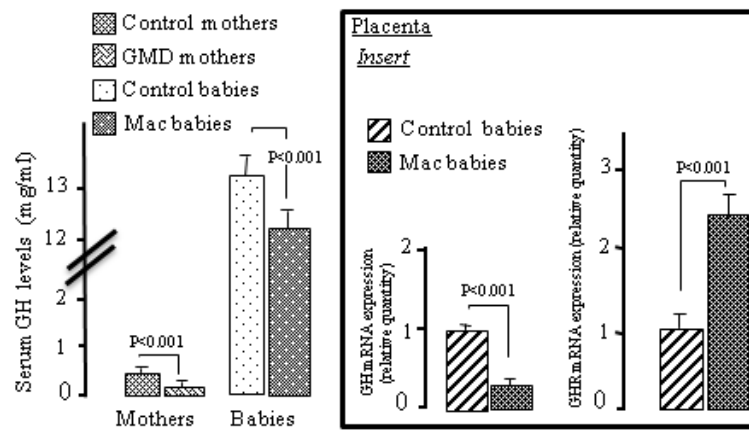
FIGURE 3

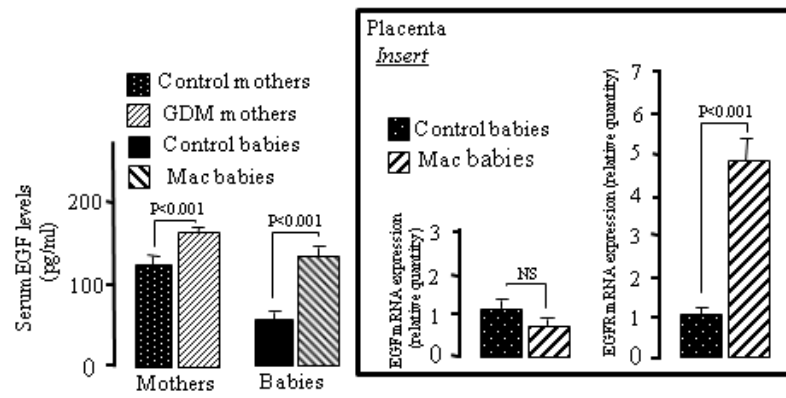
FIGURE 4

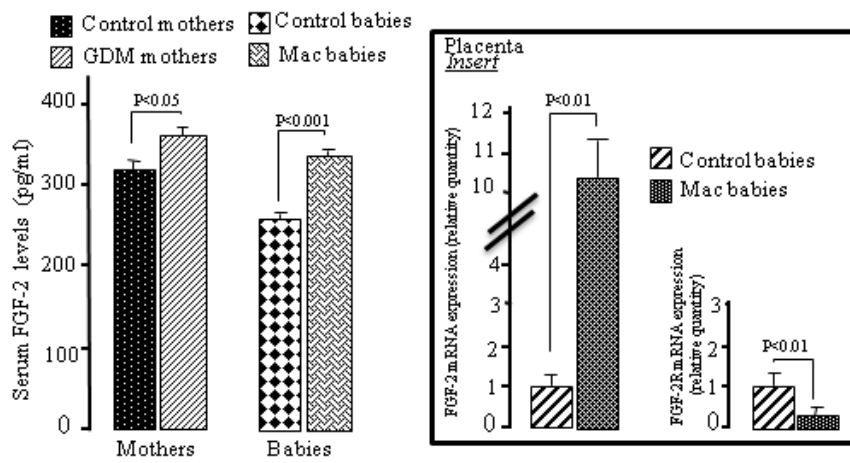
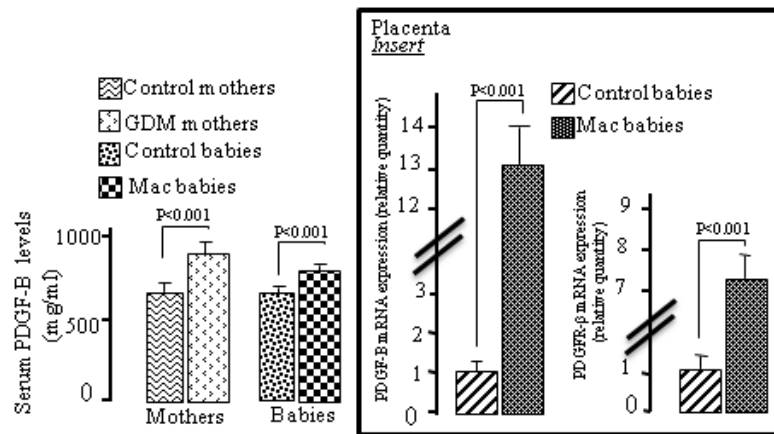
FIGURE 5

FIGURE 6

BioMed Central Pregnancy and Childbirth 2009

Growth factor concentrations and their placental mRNA expression are modulated in gestational diabetes mellitus: possible interactions with macrosomia

O. Grissa, MS^{1,2}, A. Yessoufou, Ph.D^{1,3}, I. Mrisak, MS², A. Hichami, Ph.D¹, D. Amoussou-Guenou, MD⁴, A. Grissa, MS², F. Djrolo, MD⁴, K. Moutairou, Ph.D³, A. Miled, Ph.D⁵, H. Khairi, MD⁶, M. Zaouali, MD², I. Bougmiza⁷, A. Zbidi, MD², Z. Tabka, MD, Ph.D², and N. A. Khan, Ph.D, D.Phil¹

¹University of Burgundy, UPRES EA4183 Lipids and Cell Signaling, Faculty of Life Sciences, Dijon, France; ²Department of Physiology and Functional Exploration, University Hospital Farhat Hached 4000 Sousse, Tunisia; ³Laboratory of Cell Biology and Physiology (ISBA/FAST), University of Abomey-Calavi, Bénin; ⁴Médecine Interne, Service d'Endocrinologie, Centre National Hospitalier et Universitaire (CNHU) de Cotonou, Faculté des Sciences de la Santé, University of Abomey-Calavi, 01 BP 526 Cotonou, Bénin; ⁵Department of Biochemistry, ⁶Department of Gynaecology, University Hospital Farhat Hached 4000 Sousse; ⁷Department of Community Medicine, University Hospital Farhat Hached 4000 Sousse, Tunisia.

Résumé:

Le diabète gestationnel mellitus (DGM) est une forme de diabète qui apparaît durant la grossesse. Il représente un facteur déterminant dans la croissance du fœtus conduisant à un surpoids fœtal, la macrosomie. Mise à part l'hyperglycémie maternelle, le statut endocrinien et la circulation placentaire sont des facteurs qui pourraient être impliqués aussi dans la macrosomie fœtale. L'étude a été entreprise pour enquêter sur l'implication des facteurs de croissance et leurs récepteurs dans le DGM et la macrosomie, et pour discuter du rôle de l'axe materno-fœto-placentaire dans la régulation de la croissance fœtale *in utero*. Les concentrations sériques de la GH et des facteurs de croissance, IGF-I, IGF-BP3, FGF-2, EGF et PDGF-B ont été déterminées par ELISA. L'expression des ARNm codant pour la GH, l'IGF-I, IGF-BP3, le FGF-2, le PDGF-B, le EGF, et de leurs récepteurs, c'est à dire, GHR, l'IGF-IR, le FGF-2R, le EGFR et le PDGFR- β ont été quantifiés par RT-qPCR. Les résultats montrent que les concentrations sériques d'IGF-I, IGF-BP3, EGF, FGF-2 et PDGF-B sont plus élevés chez les femmes DGM et leurs bébés macrosomiques par rapport à leurs témoins respectifs. Au niveau du placenta, L'expression de l'ARNm des facteurs de croissance a été soit surexprimée (FGF-2 ou PDGF-B) ou restée inchangée (IGF-I et EGF) chez les DGM. De même, L'expression de l'ARNm des trois récepteurs des facteurs de croissance, à savoir, l'IGF-IR, EGFR et PDGFR- β , a été régulée à la hausse dans le placenta de la femme présentant un DGM. Ce qui est

remarquable, c'est que les concentrations sériques de la GH ont été réprimées chez les femmes présentant un DGM et leurs progénitures macrosomiques. Devant l'augmentation de l'expression ARNm codant pour GHR, nous avons remarqué une diminution de celle de GH au niveau du placenta des mères DGM par rapport aux contrôles.

En conclusion, nos résultats montrent que les facteurs de croissance pourraient être impliqués dans le DGM et peuvent être aussi impliqués, en partie, dans la macrosomie *via* l'axe materno-foeto-placentaire.

Mots-clés : diabète gestationnel, macrosomie, facteur de croissance, placenta, insuline.

TROISIEME PARTIE:

Discussion générale et Perspectives

"

Discussion générale

Discussion

1. Discussion générale

Le diabète gestationnel est une pathologie multifactorielle comprenant des affections de sévérité variable. Sa prévalence est très variable selon les populations étudiées. Il est associé à court, moyen et long terme, à des complications maternelles et fœtales qui en font un problème de santé publique.

1.1. Profil des adipokines au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie

L'implication des adipokines et des cytokines Th1 et Th2 au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie est peu connue. Nous avons vu dans la première partie de cette thèse, que les cytokines produites par les cellules T jouent un rôle important dans la physiopathologie du diabète et de l'obésité. *Le but de cette étude dont les résultats sont publiés dans l'article n°1 est d'évaluer le profil des adipokines produites par le tissu adipeux et des cytokines produites par les cellules T au cours du diabète gestationnel et de l'obésité infantile.*

Dans la présente étude, les mères souffrant de diabète gestationnel étaient hyperinsulinémiques et hyperglycémiques, reflétant une diminution de leur sensibilité à l'insuline, alors que leurs bébés macrosomiques étaient seulement hyperinsulinémiques. Ce résultat est en accord avec celui de (Catalano et coll., 2003). En effet, il a été démontré qu'au cours du diabète gestationnel, le glucose maternel, après son passage par la barrière foeto-placentaire, provoquait la libération de l'insuline par le pancréas fœtal et, de ce fait, produisait l'hyper-insulinémie fœtale.

Des données récentes ont montré que la concentration plasmatique des médiateurs inflammatoires, tels que TNF- α et IL-6, est élevée dans des situations d'insulino-résistance, d'obésité et de diabète de type 2 (Dandona, Aljada, and Bandyopadhyay, 2004). *Dans la présente étude, nous avons noté que les concentrations de TNF- α et d'IL-6 étaient élevées chez les femmes ayant le diabète gestationnel.* Par ailleurs, ces fortes concentrations de TNF- α et d'IL-6 diminuaient chez ces patientes, non seulement la sensibilité à l'insuline en supprimant la transduction du signal de l'insuline, mais aussi interféraient avec l'effet anti-inflammatoire de cette hormone (Dandona, Aljada, and Bandyopadhyay, 2004).

Les adipokines, sécrétées par le tissu adipeux, sont nécessaires pour bon nombre de processus physiologiques et métaboliques (Trayhurn and Wood, 2004). En dépit de l'importance de ces agents comme médiateurs des désordres métaboliques, peu de données concernant leur implication dans le diabète gestationnel et la macrosomie sont disponibles. ***Dans la présente étude, nous avons observé que les taux d'adiponectine, un agent anti-inflammatoire*** (Arita et coll., 1999), ***sont abaissés chez les femmes ayant le diabète gestationnel***. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Meller et coll.,(2006), qui ont rapporté que les concentrations d'adiponectine sont abaissés lors de grossesses compliquées par le diabète, comparées aux grossesses non diabétiques. ***Quelle est l'importance physiologique de l'augmentation des taux de TNF- α concomitante à la diminution des concentrations d'adiponectine chez les femmes atteintes de diabète gestationnel ?*** Il a été démontré que l'adiponectine et TNF- α exercent des effets opposés sur la signalisation de l'insuline, avec TNF- α inhibant (Hotamisligil et coll., 1994b) et l'adiponectine stimulant la phosphorylation du récepteur à activité tyrosine kinase de l'insuline. Par ailleurs, il est aussi possible que TNF- α soit responsable de la faible synthèse de l'adiponectine chez les femmes souffrantes du diabète gestationnel parce que Ruan et Lodish ., (2004) ont suggéré que cette adipokine était inhibée par cet agent. Selon Lihn et coll., (2003), ces deux médiateurs pro-inflammatoires, TNF- α et IL-6, diminuent l'expression du gène de l'adiponectine. Les faibles concentrations d'adiponectine seraient aussi responsables de l'augmentation de l'hyperglycémie chez les femmes diabétiques, puisqu'il a été montré par Arita et coll., (1999) que cette adipokine, par un mécanisme d'action qui demeure inconnu, augmente la sensibilité à l'insuline. Nous voudrions également mentionner l'étude de Tsai et coll.,(2005), qui ont démontré que la diminution de la concentration de l'adiponectine maternelle et la sensibilité à l'insuline peuvent augmenter le risque de surpoids fœtal chez les femmes qui présentent un diabète gestationnel mellitus (DGM). ***Finalement, nous pouvons énoncer que TNF- α et IL-6 sont impliqués dans la pathogenèse de l'insulino-résistance, du diabète gestationnel, de l'adiposité, et des désordres lipidiques.***

La leptine est une cytokine principalement produite et sécrétée dans la circulation sanguine par les adipocytes (Zhang et coll., 1994). Son action principale est de diminuer la prise alimentaire grâce à sa fixation sur l'hypothalamus (*via* ses récepteurs, l'alpha-msh et le neuropeptide Y) ventro-médian (Halaas et coll., 1995). ***Dans la présente étude, nous avons constaté que les concentrations en leptine étaient très élevées chez les femmes souffrantes du diabète gestationnel comparées aux mères contrôles.*** Il existe une controverse à propos des

taux de leptine des mères diabétiques. Ces taux ont été rapportés soit élevés (Kautzky-Willer et coll., 2001), soit inchangés (Simmons and Breier, 2002), ou réduits (Festa et coll., 1999) dans les grossesses compliquées par le diabète, quoiqu'une étude récente (McLachlan et coll., 2006) ait montré que les concentrations en leptine maternelle sont élevées chez les femmes GDM. Ce désaccord serait le résultat des différences entre le moment du prélèvement du sang maternel (c'est-à-dire l'âge gestationnel). Toutefois, les fortes concentrations en leptine au cours du diabète gestationnel seraient le résultat de sa sécrétion par les adipocytes en présence de fortes concentrations d'oestrogène (Sivan et coll., 1998) et du placenta (Masuzaki et coll., 1998). En fait la leptine, agissant comme un signal augmentant la dépense énergétique en majorant la thermogenèse, est élevée avec persistance chez les femmes ayant eu le diabète gestationnel après la délivrance et associée à l'hyperglycémie et à l'insulino-résistance (Kautzky-Willer et coll., 2001). Il est aussi possible que l'hyperleptinémie des femmes GDM ait favorisé le développement de la macrosomie chez les foetus. Comme TNF- α et IL-6, les taux élevés de leptine observés pourraient induire un stress oxydatif qui serait, par la suite, impliqué dans la libération des médiateurs inflammatoires (Matarese et coll., 2002).

Il est important de noter que les concentrations de TNF- α , d'IL-6, d'adiponectine, et de leptine sont abaissés chez les bébés macrosomiques comparés aux bébés contrôles. Une plausible explication de ces changements n'est pas disponible. Cependant, nous pouvons citer le travail de Weiss et coll., (2003), qui ont montré que les taux d'adiponectine circulants sont significativement faibles chez les enfants obèses comparés aux enfants non obèses. Les faibles taux d'adiponectine et de leptine observés chez ces bébés macrosomiques pourraient contribuer au gain de poids car il a été montré que le déficit en leptine chez les rongeurs (Halaas et coll., 1995) et chez les humains (Montague et coll., 1998) développe une obésité prononcée.

1.2. Profil des cytokines Th1 et Th2 au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie

Il a été établi qu'au cours d'une grossesse normale, les cytokines Th1 diminuaient, alors que les cytokines appartenant aux cellules Th2 augmentaient (Raghupathy, 2001). En outre, il a été démontré que le changement du phénotype Th1 en phénotype Th2, au cours de la grossesse, favorise la production d'anticorps qui combattent non seulement les infections pendant la grossesse mais aussi offrent une immunité passive au fœtus (Reinhard et coll., 1998). *Dans l'article n°1, nous avons montré que les concentrations sériques d'IL-2 et d'IFN- γ ont diminué, alors que les concentrations d'IL-4 ne sont pas altérées pendant le diabète gestationnel ; toutefois, les taux d'IL-10, une cytokine de type Th2, ont augmenté chez ces*

mères diabétiques. Nos observations suggèrent que les faibles concentrations des cytokines Th1 et les taux élevés d'IL-10 seraient impliqués dans le maintien des grossesses compliquées par le diabète. Cependant, la non variation des taux d'IL-4 circulants serait responsable de l'induction du diabète. Notre idée peut être soutenue par les observations de Müller et coll., (2002) qui ont montré que la prédisposition au diabète était plus associée à la réduction de l'IL-4 qu'à une induction d'IFN- γ dans les îlots de souris mâle BALB/c rendue diabétique. Par ailleurs, il a été montré que la forte concentration de cortisol observée chez les femmes enceintes (Elenkov et coll., 2001), induit l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 (Volk et coll., 2003).

Dans le présent travail, le rapport des cytokines démontre que, lors du diabète gestationnel, le phénotype Th1 diminue. Ce résultat est en accord avec ceux de Khan et coll., (2006) chez le rat et de Yessoufou et coll., (2006) chez la souris qui ont observé le même profil cytokinique. *Cependant, en comparant le rapport des cytokines Th1/Th2 chez les humains, nous avons constaté une augmentation du phénotype Th1 chez nos bébés macrosomiques.* Notre travail fut la première étude qui ait évalué le profil des cellules T lors de la macrosomie chez les humains. Dans la présente étude, puisque les enfants macrosomiques ont présenté une augmentation des cytokines pro-inflammatoires, il est possible que ces cellules T activées contribuent, en partie, au développement chez ces derniers, à un âge avancé, du diabète et de l'obésité (Lapolla et coll., 2005; Merzouk and Khan, 2003).

Le diabète gestationnel est associé à une hyper-insulinémie, une hyperglycémie, à de fortes concentrations de leptine et de médiateurs inflammatoires tels que TNF- α et IL-6, et à de faibles taux d'adiponectine ; cette pathologie est aussi associée à une diminution du phénotype Th1. Les bébés macrosomiques issus de mères diabétiques exhibent, quant à eux, une hyper-insulinémie et de faibles taux de ces adipokines et cytokines, associés à une augmentation des cellules T de phénotype Th1. Des études complémentaires sont nécessaires pour explorer l'implication des cellules T dans l'apparition du diabète relatif à l'inflammation/obésité et leur rôle dans les modifications des adipokines au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie.

Il a été suggéré que les taux élevés de ces cytokines chez les diabétiques seraient le résultat du stress oxydatif et des changements inflammatoires causés par l'hyperglycémie (Sternberg et coll., 1992). Nous nous proposons à présent d'évaluer dans *l'article n°2* le statut antioxydant et le profil des lipides circulants chez les mères diabétiques et leurs progénitures macrosomiques.

1. 3. Statut antioxydant, diabète gestationnel et macrosomie

Le rôle du stress oxydatif au cours du diabète a été bien documenté (Caimi, Carollo, and Lo Presti, 2003; Hunt, Smith, and Wolff, 1990; Merzouk and Khan, 2003). Cependant, peu d'études ont été réalisées sur le statut antioxydant des bébés macrosomiques nés de mères ayant eu le diabète gestationnel, bien qu'une grossesse compliquée par le diabète représente un important facteur de risque pour la suralimentation fœtale et le développement de l'obésité à l'âge adulte (Merzouk et coll., 2002; Yessoufou et coll., 2006).

Dans la présente étude (*Article n°2*), *le diabète gestationnel et la macrosomie sont associés à une diminution du taux de vitamine E, sans variation du taux de vitamine A. En outre, la vitamine C avait augmenté chez les mères alors qu'il n'y avait pas de modifications significatives chez leurs bébés macrosomiques.* Il existe des travaux contradictoires sur les concentrations plasmatiques en vitamines au cours du diabète. Yessoufou et coll., (2005) ont montré, chez les patients diabétiques de type 2, une diminution des taux de vitamine E. D'autre part, Makimattila et coll., (1999) ont rapporté que les taux plasmatiques en vitamines C et E chez les patients diabétiques de type 2 n'avaient significativement pas diminué. Sundaram et coll., (1996) ont obtenu une diminution des taux de vitamines E et C chez des diabétiques. Nos résultats sont, cependant, en accord avec ceux obtenus par Peuchant et coll., (2004) qui ont montré que les concentrations en vitamine E étaient significativement faibles chez les mères ayant eu le diabète gestationnel comparées aux patientes contrôles, alors qu'aucune variation en vitamine A n'a été observée. Merzouk et coll., (2003) avaient préalablement suggéré que la diminution de la vitamine E pourrait être due à son fort taux d'utilisation car elle protégerait du stress oxydatif. En effet, il a été démontré que le stress oxydatif est induit, à la fois, par l'augmentation des radicaux libres et par la perturbation du système "d'ébouage" de ces derniers au cours du diabète (Sinclair, 1993; Therond et coll., 2000). La corrélation inverse entre le faible taux en vitamine E et le taux élevé en vitamine C, chez les mères ayant eu un diabète gestationnel, s'explique par le fait que la vitamine C et le glutathion réduit régénèrent la vitamine E (Therond et coll., 2000; Zaken, Kohen, and Ornoy, 2001). Les faibles taux en

vitamine E sont corrélés avec l'hyperglycémie des mères diabétiques. Il a été en effet rapporté que l'hyperglycémie chronique peut augmenter le stress oxydatif, ce qui expliquerait les faibles taux en vitamines E (Hunt, Smith, and Wolff, 1990). En outre, la diminution de la vitamine E a été aussi observée chez les patients diabétiques avec une augmentation des produits de la peroxydation lipidique associée à l'hypertriglycéridémie (Kajanachumpol, Komindr, and Mahaisiriyodom, 1997). ***Dans la présente étude, les taux élevés en vitamine C observés chez les mères diabétiques seraient causés par l'hyperglycémie ;*** en effet, il a été démontré que la vitamine C est synthétisée chez les mammifères à partir du glucose par la voie de l'acide D-glucuronique (Smirnoff, 2001).

Concernant les enzymes antioxydants, ***nous avons constaté (Article n°2) une baisse de l'activité de la SOD chez les mères diabétiques et leurs progénitures macrosomiques*** comparés aux sujets témoins. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres investigateurs chez les êtres humains et lors d'études expérimentales. Biri et coll., (2006), Chaudhari et coll., (2003), et Peuchant et coll., (2004) ont obtenu des résultats similaires chez les femmes GDM et diabétiques de type 1. Cependant, Aydin et coll., (2001) ont rapporté que l'activité de la SOD augmentait chez les diabétiques de type 2, alors que Ruiz et coll., (1999) n'ont trouvé aucune différence significative chez les diabétiques de type 1 comparés aux sujets contrôles. La raison de cette controverse sur l'activité de la SOD au cours du diabète pourrait être attribuée aux traitements donnés aux patients, aux complications associées et à la durée de la maladie (Merzouk et coll., 2003; Telci et coll., 2000; Yessoufou et coll., 2005). S'agissant de l'activité de cet enzyme au cours de la macrosomie, une seule étude, celle de (Kinalski et coll., 2001), a montré la diminution de son activité chez les enfants nés de mères diabétiques, ce qui est confirmé par nos travaux.

1.4. Profil des lipides circulants au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie

Dans la présente étude, ***les mères GDM aussi bien que les mères contrôles avaient une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie***, quoique ces paramètres ne fussent pas statistiquement différents. ***Les bébés macrosomiques présentaient des taux élevés en triglycérides et en cholestérol total et libre comparés aux nouveau-nés témoins (Article n°2)***. Nos résultats confirment plusieurs études qui ont montré que les taux en cholestérol total et en triglycérides sont significativement élevés pendant la grossesse et qu'il n'y avait pas de

différence significative entre mères diabétique et contrôle (Di Cianni et coll., 2005; Toescu et coll., 2004).

Les forts taux en lipides et l'augmentation du stress oxydatif chez les patients diabétiques pourraient favoriser la prédisposition à la peroxydation lipidique. ***Les mères diabétiques et leurs nouveau-nés macrosomiques ont montré une augmentation significative des TBARS (Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique) (Article n°2)***, ce qui est en accord avec les observations faites par plusieurs auteurs (Orhan et coll., 2003; Rajdl et coll., 2005). Nos résultats sous-entendent l'hypothèse selon laquelle les TBARS représenteraient un marqueur clinique prometteur du stress oxydatif. Bis-Gluchowska et coll., (2001) ont aussi obtenu de forts taux de TBARS dans le cordon sanguin de nouveau-nés issus de mères diabétiques de type 1. En fait, la peroxydation lipidique a été impliquée dans une variété de situations physiologique, pathologique, et clinique, incluant les complications liées à la grossesse, principalement la pré-éclampsie et le diabète (Rajdl et coll., 2005).

La défense antioxydante altérée observée chez les bébés macrosomiques à la naissance pourrait causer des désordres métaboliques à l'âge adulte. En effet, le statut antioxydant des bébés macrosomiques, à l'âge adulte, demeure bas. A l'âge de 2 à 3 mois, ils présentent : (1) une hyperglycémie et une hyper-insulinémie, (2) des taux élevés de TBARS plasmatiques, (3) une diminution de la capacité d'absorbance des radicaux oxygénés qui se traduit par la faible défense antioxydante, (4) de faibles concentrations en vitamines C et A, et (5) une diminution des activités de la SOD et d'autres enzymes antioxydants comme la glutathion peroxydase. Merzouk et coll., (1999) ont aussi montré chez les enfants macrosomiques que cette pathologie était associée à des altérations de la composition et de la concentration en lipoprotéines à la naissance et que certaines d'entre elles persistaient souvent après un mois de vie. Ces auteurs ont rapporté aussi que les nouveau-nés macrosomiques avaient des taux très élevés en lipides, en apolipoprotéines A-1 et B-100, et en lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL₂ et HDL₃). ***En prenant en compte ces altérations, on peut envisager des thérapies complémentaires avec des antioxydants, incluant des vitamines qui pourraient protéger l'organisme contre la production de radicaux libres et la diminution de la capacité antioxydante. De tels traitements peuvent être bénéfiques aux femmes courant le risque de développer un diabète gestationnel.***

Plusieurs altérations, observées à la naissance chez des enfants issus de mères diabétiques, tant dans le métabolisme des carbohydrates et des lipides, que dans le système immunitaire, persistent encore à l'âge adulte (Cordero and Landon, 1993; Fowden, 1989; Merzouk et coll., 1999; Plagemann et coll., 1997; Pribylova and Dvorakova, 1996). ***Existe-t-il le rôle d'une "mémoire métabolique" in utero au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie ? (Article 3).***

1.5. La "mémoire métabolique" in utero semble être impliquée dans la macrosomie au cours du diabète gestationnel

Le processus par lequel un stimulus ou une lésion entraîne, à une période délicate ou critique du développement, des effets à long terme, est appelé **programmation**. En fait, cette programmation *in utero* semble créer une sorte de "mémoire métabolique" puisque les anomalies dans le système physiologique (hypercholestérolémie, hypertriglycémie, hyperinsulinémie, hyperglycémie, statut antioxydant altéré, système immunitaire perturbé, etc.), observées pendant la période gestationnelle, sont responsables de "l'apparition" chez le nouveau-né à l'âge adulte, de maladies comme le diabète de type 2 et l'obésité (Jimenez-Moleon et coll., 2002; Khan, 2006; Merzouk and Khan, 2003; Merzouk et coll., 1999; Palinski and Napoli, 2002; Yessoufou et coll., 2005). Desai et coll., (1995) ont démontré que le taux de glucose et le métabolisme lipidique chez l'adulte sont programmés pendant la vie fœtale.

Les modifications métaboliques *in utero*, responsables de l'apparition de ces anomalies à l'âge adulte, restent à être approfondies. Cependant, il est possible que l'hyper-insulinémie fœtale soit un facteur tératogène endogène au cours des périodes critiques de développement du fœtus, aboutissant à des changements structuraux permanents et fonctionnels des organes et une programmation conséquente de la "mémoire métabolique" (Dorner and Plagemann, 1994).

Des études expérimentales, réalisées sur des animaux, ont mis en évidence le rôle clé de l'hypothalamus fœtal qui peut être "programmé" par des changements transitoires de l'état endocrine prénatal (Pribylova and Dvorakova, 1996). Nous pouvons citer l'étude de Yura et coll., (2005) qui ont observé que la malnutrition *in utero* est étroitement associée à l'obésité à l'âge adulte. Ils ont aussi démontré que l'administration précoce de la leptine à des souris sous-alimentées modifiait la régulation énergétique par l'hypothalamus et contribuait au

développement de l'obésité. Toutefois, l'implication d'autres facteurs dans les modifications *in utero* reste à être explorée dans le futur.

1. 6. Diabète gestationnel, macrosomie et facteurs de croissances :

Des études récentes ont montré que, autre que l'insuline, il existe une variété de facteurs de croissance qui jouent un rôle important dans la croissance fœtale (Zollers et coll., 2001). *Dans la présente étude, Les mères diabétiques et leurs nouveau-nés macrosomiques ont montré une augmentation significative d'IGF-I (insulin-like growth factor-1) (Article n°3)*, En effet, plusieurs études ont montré l'augmentation au cours de la grossesse des taux sériques d'IGF-I, dans les deux compartiments maternel et fœtal. De plus, il existe une corrélation positive entre l'augmentation des concentrations d'IGF-I et le poids fœtale à la naissance (Lauszus, Klebe, and Flyvbjerg, 2001; Roth et coll., 1996; Zollers et coll., 2001). Ceci montre bien l'implication directe de ces facteurs dans la croissance fœtale. Dans le cas où cette grossesse est complexée par un Diabète Gestationnel Mellitus (DGM), on remarque une augmentation des taux sériques d'IGF-I maternel et fœtal (Roth et coll., 1996; Yan-Jun et coll., 1996a).

Roth et coll.(Roth et coll., 1996) ont démontré que le DGM n'avait aucune influence sur l'expression de l'ARNm d'IGF-I placentaire. En plus, du fait que l'IGF-I ne traverse pas la barrière placentaire (Davenport et coll., 1990), donc il est improbable que l'augmentation d'IGF-I au niveau fœtal ne puisse être due qu'à l'élévation du taux d'IGF-I maternel. Néanmoins, cette élévation des taux d'IGF-I fœtal, peut être impliquée dans le gain de poids des bébés macrosomiques et ceci à cause de la similarité structurale qu'il présente avec l'insuline, induisant ainsi une croissance des cellules somatiques et une prolifération cellulaire.

D'un autre côté IGF-I influence le transport du glucose et des acides aminés à travers le placenta. En effet, tout en ne traversant pas la barrière placentaire, IGFs et l'insuline maternelle, modulent le flux des nutriments vers le fœtus. La croissance du fœtus dépend donc de la qualité de l'adaptation du métabolisme maternel à la grossesse, sous l'influence des facteurs de croissance placentaires sécrétés dans le compartiment maternel. Par ailleurs, Bhaumick et al. (Bhaumick, Danilkewich, and Bala, 1988) ont démontré qu'il y a une augmentation du nombre des récepteurs IGF-IR placentaires au cours d'un DGM. Cette augmentation va faciliter le mécanisme d'action des IGF-I chez les bébés macrosomiques.

Chez le fœtus, malgré des concentrations sériques fœtales notables et la présence de récepteurs tissulaires, l'hormone de croissance hypophysaire (hGH) ne joue pas un rôle important dans la croissance fœtale. Ainsi, l'anencéphalie n'est généralement pas associée à un retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Meda et coll., 1995). A l'inverse, l'insuline et les facteurs tissulaires de croissance (IGF-I et IGF-II) sont des acteurs établis de la croissance fœtale (Lindsay et coll., 2007). D'un autre côté, cette croissance fœtale est également limitée par l'environnement utérin et nutritionnel maternel. On observe ainsi une hypotrophie fœtale dans les grossesses multiples et dans le cas d'une malnutrition.

La biodisponibilité d'IGF-1 est régulée par IGF-BP3. En effet, complexé avec IGF-1, IGF-BP3 va jouer le rôle de réservoir à cette hormone au niveau du sang circulant (Lee, Conover, and Powell, 1993). *Les mères diabétiques et leurs nouveaux nés macrosomiques présentaient des taux élevés en IGF-BP3 (insulin-like growth factor-binding protein 3) comparés aux témoins (Article n°3)*. En effet, il a été démontré qu'au cours d'un DGM il ya une augmentation du taux d'IGF-BP3 au niveau du sang fœtal (Yan-Jun et coll., 1996b) accompagné d'une baisse d'ARNm d'IGF-BP3 placentaire. *Dans la présente étude, l'augmentation significative en IGF-BP3 chez les DGM et leurs enfants macrosomiques n'est pas accompagnée par une augmentation des taux d'ARNm d'IGF-BP3 placentaire*. D'où il est possible que l'augmentation de l'insuline (Grissa et coll., 2007; Westgate et coll., 2006) et de l'IGF-I, chez les mères et les nouveaux nés, soient responsables de l'élévation de la synthèse d'IGF-BP3 placentaire. En effet, il a été démontré que l'insuline est responsable de la régulation du taux d'IGF-BP3 chez les DGM (Bereket et coll., 1995). De plus, un traitement *in vitro* avec l'insuline et de l'IGF-I stimule la sécrétion d'IGF-BP3.

Le placenta est aujourd'hui identifié comme un organe endocrine non autonome influencé par des facteurs maternel et fœtaux, en particulier : l'hormone de croissance, IGFs et l'insuline (Garnica and Chan, 1996), justifiant la notion d'unité materno-placento-fœtale. Le placenta sécrète l'hormone de croissance placentaire (ou GH variant GH-V), qui elle-même responsable de l'élévation des taux d'IGF-I maternel pendant la grossesse.

Dans la présente étude, nous avons observé une diminution significative des taux de GH pituitaire au niveau maternel présentant un GDM et leur enfant macrosomique. De même nous remarquons une diminution des taux d'ARNm du GH au niveau placentaire (Article n°3). En fait, il a été démontré que le taux de GH diminue progressivement au cours d'une grossesse normale (Mirlesse et coll., 1993), ou atteinte d'un DGM (Lee et coll., 1999). Ceci peut s'expliquer du fait que l'insulino-résistance, due au DGM, va induire une élévation des taux plasmatiques en insuline ce qui produit une diminution des taux de GH (Lee et coll., 1999).

Lacroix et coll. (Lacroix et coll., 1999). ont démontré, que chez les moutons, l'exposition du placenta à un taux élevé d'IGF-I peut induire une inhibition du taux de GH pituitaire. D'un autre côté, Misra et coll (Misra et coll., 2008). ont montré que la baisse du taux de GH pituitaire chez les femmes obèses est associée à une adiposité viscérale, à une insulino-résistance et à un taux lipidique élevé. Cette observation suggère que la diminution du taux de GH, produit par l'hyper-insulinémie, d'une part, et le taux élevé d'IGF-I, d'autre part, pourrait être expliquée par le gain du poids.

Il a aussi été montré que l'EGF possède des propriétés mimétiques à celles de l'insuline, comme la prolifération, la différenciation cellulaire et la régulation de la croissance fœtal-placentaire (Gogg and Smith, 2002; Lacroix et coll., 1999). *Nos résultats ont montré une augmentation de cette hormone chez les bébés macrosomiques et leurs mères. Cette augmentation est accompagnée d'une surexpression de l'ARNm des EGFR et d'une diminution ARNm des EGF placentaires (Article n°3).* Loukovaara et coll. Loukovaara et coll., (2004) ont montré que la DGM était accompagnée par une augmentation des taux fœtaux en EGF. En effet, EGF a la capacité de promouvoir le transport des aminoacides dans le placenta du rat, et par la suite influencer la croissance fœtale (Masuyama, Hiramatsu, and Kudo, 1996).

Dans la présente étude, nous avons observé une augmentation des FGF-2 chez les mères DGM et leurs bébés macrosomiques. Au contraire, nous avons noté une grande expression de l'ARNm des FGF-2 au niveau du placenta des mères diabétiques ce qui peut contribuer à une augmentation de la synthèse de FGF-2 (Article n°3). En effet FGF-2 est

aussi un facteur de croissance ressemblant à l'insuline, incapable de traverser la barrière placentaire (Hofmann and Abramowicz, 1990). De nos jours on n'est pas capable de bien expliquer comment le GDM augmente la concentration fœtale en FGF-2 sérique. Cependant, M. Loukovaara et coll (Loukovaara et coll., 2004) ont essayé d'expliquer cette augmentation par le fait qu'elle représente une réponse métabolique du compartiment fœto-placentaire à l'hyperglycémie induite par le diabète. Hill et coll (Hill et coll., 1995) ont montré que le placenta représente le site principal de synthèse de FGF-2 (Amaya, Musci, and Kirschner, 1991) et que cette dernière est très exprimée au niveau du tissu embryonnaire où elle va exercer ses pouvoirs mitogène et morphogénique. Une autre étude (Hill and Milner, 1985) a montré que le taux élevé d'FGF-2 est responsable de l'augmentation de l'incidence de la macrosomie.

Les facteurs de croissance dérivée des plaquettes (PDGF) et de leurs récepteurs (PDGFR) sont des importants régulateurs des interactions tissulaires, des migrations cellulaires, de la prolifération et de la formation de la matrice extracellulaire durant le développement des mamelles embryonnaires (Hoch and Soriano, 2003). PDGF-B et PDGF-D se lie principalement à PDGFR- β qui est impliqué dans l'organogénèse, alors que PDGF-A se lie à PDGFR- α qui est responsable de l'embryogénèse (Hoch and Soriano, 2003). PDGF-C se lie aux deux types de récepteurs PDGFR- α et PDGFR- β et joue un rôle limité dans le développement fœtal (Hoch and Soriano, 2003). PDGF-B et PDGFR- β sont essentielles pour le développement fœtal normal, de point de vue structural et fonctionnel des vaisseaux et des capillaires (Nystrom et coll., 2006). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la variation de deux paramètres : le taux de PDGF-B plasmatique et l'expression de l'ARNm du PDGF-B placentaire ainsi que leur récepteur. ***On a montré une augmentation, chez les DGM, de l'expression de PDGF-B placentaire et de son récepteur PDGFR- β .*** Cette augmentation des taux placentaires est accompagnée par ***une élévation des taux plasmatiques de PDGF-B chez les DGM et leurs nouveaux nés.*** En effet la production en PDGF-B du myomètre, augmente pendant la grossesse, cette augmentation est associée à l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules musculaires de l'utérus, caractéristiques d'un utérus gestationnel.

Heiring et coll.(Heinig et coll., 2000) ont remarqué une élévation considérable des taux d'ARNm de PDGFR chez les mères présentant un DGM en les comparant à des mères normales. Dans la mesure du possible, et à chaque fois que les inducteurs physiologiques du taux de PDGFR- β sont sollicités, c'est l'insuline qui en est responsable. En effet, il a été démontré que l'insuline accroît l'effet mitogène de PDGFR- β sur des cellules des muscles

lisses en activant la cascade signalétique cellulaire, particulièrement avec la phosphatidylinositol-3-kinase du PDGFR- β . De même, Zhuang et coll. (Zhuang et coll., 2008) ont récemment démontré que l'insuline accroît la phosphorylation du PDGFR- β et amplifie la capacité mitogène de PDGFR-B.

En présentant un taux élevé et par l'intermédiaire de PDGFR- β , PDGFR-B peut aussi participer dans l'angéogénèse placentaire, au cours d'un DGM, en formant une boucle de stimulation dans les cellules des capillaires endothéliales afin de promouvoir la prolifération cellulaire attendue (Holmgren et coll., 1991).

D'après ce qui précède nous pouvons conclure que chacun des facteurs de croissance étudiés influence, d'une manière ou d'une autre, la croissance fœtale. La question qui se pose : *quels sont les facteurs de croissance, maternel et fœtal, déterminants dans l'élévation du poids fœtal ?*

Pour répondre à cette question nous avons effectué une régression linéaire multiple incrémentielle, entre les 6 facteurs de croissance maternelle et fœtale étudiés et le poids fœtal (variable indépendant). Ceci nous a permis de connaître les facteurs déterminants qui sont : **PDGF-M, FGF2-M maternelle et FGF2-F fœtale (Article n°3)**, suivant l'équation :

$$\text{Poids foetal (kg)} = 5,041 \cdot 10^{-3} \times \text{PDGF-M} + 2,743 \cdot 10^{-3} \times \text{FGF2-M} + 7,673 \cdot 10^{-3} \times \text{FGF2-F} - 1,264$$

Donc il suffit de doser PDGF-M, FGF2-M maternelle et FGF2 fœtale pour pouvoir estimer le poids du nouveau né et prévoir la macrosomie.

L'insuline et les facteurs de croissance apparaissent comme des médiateurs clefs de l'apport énergétique au fœtus, lui-même sous la dépendance de la coopération materno-placentaire. Une bonne compréhension de la croissance fœtale et de sa pathologie est donc indissociable d'une étude approfondie de la physiologie placentaire.

Diabète et macrosomie

Perspectives

2. Perspectives

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude nous ont inspirés un certain nombre d'interrogations :

* Nous avons montré que le diabète gestationnel et la macrosomie s'accompagnent d'une **insulino-résistance**. Le fait qu'il existe une période de latence relativement longue entre l'obésité infantile et la survenue d'un diabète de type 2, même chez des sujets porteurs des différents facteurs de prédisposition, autorise certaines suggestions :

- Les approches de prévention de cette insulino-résistance doivent privilégier les **mesures hygiéno-diététiques** (régime alimentaire et exercice physique), mais des **mesures pharmacologiques** (metformine, glitazones : insulino-sensibilisateurs) doivent éventuellement être impliquées en cas de réponse insuffisante au régime et/ou à l'exercice physique chez les sujets à très haut risque.

- Les cytokines inflammatoires, associées à une augmentation du **PAI1** (*Plasminogen Activator Inhibitor 1*), pourraient contribuer à favoriser les fausses couches spontanées précoces, particulièrement fréquentes dans les situations avec insulino-résistance. Il s'agira également d'évaluer le **profil de cette hormone en vue de corriger l'insulino-résistance et diminuer les fausses couches et les mortalités périnatales**.

- De plus, l'insulino-résistance incriminée est l'élément majeur du **Syndrome des Ovaires Polykystiques** (SOPK), principale cause de perturbation de l'ovulation chez la femme. Il s'agira donc de corriger cet état en vue de prévenir certaines malformations congénitales observées chez les bébés macrosomiques.

* L'effet thérapeutique du **sang du cordon ombilical** a été souvent évoqué. Récemment, des essais ont été réalisés par une équipe américaine (résultats non publiés) sur des enfants ayant le diabète de type 1 auxquels a été injecté le sang du cordon ombilical où est détectée la totalité des cellules T activées. Les résultats obtenus indiquent que cette thérapie permettait de diminuer de moitié la dose journalière d'insuline requise et pourrait guérir à terme l'enfant. **Nous nous proposons donc de déterminer, à travers divers dosages, les éléments anti-inflammatoires qui y sont contenus.**

* **Femibion**[®] est un complexe vitaminique oral. En Allemagne, **Femibion**[®]400-DHA est recommandé aux femmes enceintes dès la 13^e semaine de grossesse. Puisque DHA exerce des

effets bénéfiques sur le diabète gestationnel et la macrosomie, nous envisageons démontrer l'hypothèse selon laquelle cette molécule, administrée 15 jours avant la grossesse, produirait des effets bénéfiques sur le diabète gestationnel et diminuerait l'incidence de la macrosomie. Il s'agira donc pour nous **d'évaluer l'efficacité de Femibion®400-DHA dans la modulation du statut antioxydant et du profil inflammatoire du diabète gestationnel et sur l'incidence de la macrosomie.**

* Le rôle de la malnutrition et de la suralimentation maternelle dans l'aggravation du diabète gestationnel et de l'obésité infantile a été souvent évoqué. Par ailleurs, le développement du pancréas endocrine et ses altérations parfois irréversibles sont induits par la malnutrition maternelle. Aussi, plusieurs plantes de la **pharmacopée africaine**, notamment *Anacardium occidentale*, *Cassia occidentalis*, *Ficus glumosa*, *Jatropha curcas*, *Momordica charantia*, etc. ont été décrites comme possédant des propriétés anti-diabétiques (Adjanohoun et coll., 1989). **Nous envisageons donc de valider, à partir d'extraits de certaines de ces plantes à bas coût utilisées comme un traitement de cette pathologie depuis des siècles en Afrique Noire, leur efficacité anti-diabétique.**

* Les prévisions de l'OMS laissent entrevoir une expansion dramatique du diabète et des pathologies associées, notamment dans les pays en voie de développement. Nous constatons aisément l'obésité qui se développe non seulement dans les pays occidentaux, mais aussi dans des populations moins favorisées. Nous savons aussi toute l'importance qu'ont les pathologies cardiovasculaires comme cause de décès et d'invalidation. **Préparons-nous les composants de ce syndrome *in utero* ?** Pour partie, la réponse semble bien affirmative, mais nous ignorons par quels mécanismes précisément. Les études épidémiologiques nous permettent d'identifier ces phénomènes, **mais elles ne nous permettent pas d'élucider les mécanismes impliqués dans cette programmation. C'est donc un vaste enjeu que de les déterminer.**

Les études présentées dans ce mémoire, nous ont permis de répondre à certaines questions concernant la physiopathologie du diabète gestationnel et de la macrosomie. Cependant, il nous reste encore du chemin à parcourir afin d'éclaircir les mécanismes impliqués dans la "mémoire métabolique" *in utero*, dans l'amélioration de l'insulino-résistance, de l'état inflammatoire et du système immunitaire et d'en prévenir les conséquences désastreuses pour la mère et pour l'enfant.

Références

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahima, R. S., and Flier, J. S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11(8), 327-32.
- Ailhaud, G. (2006). Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol* 329(8), 570-7.
- Amaya, E., Musci, T. J., and Kirschner, M. W. (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 66(2), 257-70.
- Anastasiou, E., Lekakis, J. P., Alevizaki, M., Papamichael, C. M., Megas, J., Souvatzoglou, A., and Stamatelopoulos, S. F. (1998). Impaired endothelium-dependent vasodilatation in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care* 21(12), 2111-5.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Kumada, M., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Shimomura, I., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (2002). Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105(24), 2893-8.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1), 79-83.
- Ategbo, J., Grissa, O., Yessoufou, A., Hichami, A., Dramane, K., Moutairou, K., Miled, A., Grissa, A., Jerbi, M., Tabka, Z and NA Khan. (2006). Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(10), 4137-4143.
- Aydin, A., Orhan, H., Sayal, A., Ozata, M., Sahin, G., and Isimer, A. (2001). Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 34(1), 65-70.
- Babawale, M. O., Lovat, S., Mayhew, T. M., Lammiman, M. J., James, D. K., and Leach, L. (2000). Effects of gestational diabetes on junctional adhesion molecules in human term placental vasculature. *Diabetologia* 43(9), 1185-96.

- Bach, J. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 15(4), 516.
- Bahia, L., Aguiar, L. G., Villela, N., Bottino, D., Godoy-Matos, A. F., Geloneze, B., Tambascia, M., and Bouskela, E. (2006). Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics (Sao Paulo)* 61(5), 433-40.
- Bajari, T. M., Nimpf, J., and Schneider, W. J. (2004). Role of leptin in reproduction. *Curr Opin Lipidol* 15(3), 315-9.
- Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H., and Myers, M. G., Jr. (2000). Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275(19), 14563-72.
- Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., Vidal, H., and Hainque, B. (2000). Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85(9), 3338-42.
- Bastard, J. P., Maachi, M., Van Nhieu, J. T., Jardel, C., Bruckert, E., Grimaldi, A., Robert, J. J., Capeau, J., and Hainque, B. (2002). Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87(5), 2084-9.
- Batallan, A., Goffinet, F., Paris-Llado, J., Fortin, A., Breart, G., Madelenat, P., and Benifla, J. L. (2002). [Fetal macrosomia: management, obstetrical and neonatal results. Multicenter case-control study in 15 maternity hospitals in Paris and the Ile de France area]. *Gynecol Obstet Fertil* 30(6), 483-91.
- Baumann, H., Morella, K. K., White, D. W., Dembski, M., Bailon, P. S., Kim, H., Lai, C. F., and Tartaglia, L. A. (1996). The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16), 8374-8.
- Ben Sahra, I., Le Marchand Brustel, Y., Tanti, J., and Bost, F. (2008). Obésité et cancers du côlon et de la prostate: implication des adipokines. *Obésité* 3(2), 72-77.
- Bennett, B. D., Solar, G. P., Yuan, J. Q., Mathias, J., Thomas, G. R., and Matthews, W. (1996). A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol* 6(9), 1170-80.
- Bensa, J. C. (2005). Introduction à l'Immunologie. In "DC1".

- Bereket, A., Lang, C. H., Blethen, S. L., Fan, J., Frost, R. A., and Wilson, T. A. (1995). Insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis in children with insulin-dependent diabetes mellitus: a possible role for insulin in the regulation of IGFBP-3 protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 80(8), 2282-8.
- Berg, A. H., Combs, T. P., and Scherer, P. E. (2002). ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13(2), 84-9.
- Bertherat, J. (1996). Contrôle transcriptionnel du développement de la cellule somatotrope et de l'expression de gène de l'hormone de croissance. *Med Théor* 2(05 hors série), 7-15.
- Best, C. (1956). The first clinical use of insulin. *Diabetes* 5, 65-67.
- Bhaumick, B., Danilkewich, A. D., and Bala, R. M. (1988). Altered placental insulin and insulin-like growth factor-I receptors in diabetes. *Life Sci* 42(17), 1603-14.
- Binoux, M. (1995). The IGF system in metabolism regulation. *Diabete Metab* 21(5), 330-7.
- Binoux, M. (1996). Protéines de liaison des IGF: leur rôle dans la régulation de la croissance. *Med Théor* 2(05 hors série), 32-39.
- Binoux, M., Lalou, C., Lassarre, C., and Segovia, B. (1994). Regulation of IGF bioavailability by IGFBP proteases, Vol. 4, pp. 53-53. CHURCHILL LIVINGSTONE.
- Biri, A., Onan, A., Devrim, E., Babacan, F., Kavutcu, M., and Durak, I. (2006). Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta* 27(2-3), 327-32.
- Bis-Gluchowska, M., Marciniak, B., Szpringer-Bogun, E., Rola, R., Leszczynska-Gorzela, B., and Oleszczuk, J. (2001). [Determination of antioxidative-peroxidative balance in the cord blood of newborns delivered to mothers with diabetes type G1]. *Ginekol Pol* 72(12A), 1255-8.
- Blat, C., Delbe, J., Villaudy, J., Chatelain, G., Golde, A., and Harel, L. (1989). Inhibitory diffusible factor 45 bifunctional activity. As a cell growth inhibitor and as an insulin-like growth factor I-binding protein. *J Biol Chem* 264(21), 12449-54.
- Boden, G. (1996). Fuel metabolism in pregnancy and in gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol Clin North Am* 23(1), 1-10.
- Borel, J. P., Maquart, F. X., Peuch, C. L., Randoux, A., Gillery, P., Bellon, G., and Monboisse, J. C. (1997). "Biochimie dynamique." 2 ed. De Boeck Université.

- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., and Binetruy, B. (2005a). The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 87(1), 51-6.
- Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., Prot, M., Dani, C., Hofman, P., Pages, G., Pouyssegur, J., Le Marchand-Brustel, Y., and Binetruy, B. (2005b). The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes* 54(2), 402-11.
- Bouloumie, A., Drexler, H. C., Lafontan, M., and Busse, R. (1998). Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83(10), 1059-66.
- Brousse, C. (2003). Les inhibiteurs du TNF Inhibitors of TNF. *La Revue de Médecine Interne* 24(2), 123-126.
- Butte, N. F. (2000). Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 71(5 Suppl), 1256S-61S.
- Caimi, G., Carollo, C., and Lo Presti, R. (2003). Diabetes mellitus: oxidative stress and wine. *Curr Med Res Opin* 19(7), 581-6.
- Catalano, P. M. (1994). Carbohydrate metabolism and gestational diabetes. *Clin Obstet Gynecol* 37(1), 25-38.
- Catalano, P. M., Huston, L., Amini, S. B., and Kalhan, S. C. (1999). Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 180(4), 903-16.
- Catalano, P. M., Kirwan, J. P., Haugel-de Mouzon, S., and King, J. (2003). Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *J Nutr* 133(5 Suppl 2), 1674S-1683S.
- Cavan, D., Bain, S., and Barnett, A. (1992). The genetics of type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *J Med Genet* 29(7), 441-6.
- Ceriello, A., Bortolotti, N., Crescentini, A., Motz, E., Lizzio, S., Russo, A., Ezsol, Z., Tonutti, L., and Taboga, C. (1998). Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 28(4), 329-33.
- Ceriello, A., Falletti, E., Bortolotti, N., Motz, E., Cavarape, A., Russo, A., Gonano, F., and Bartoli, E. (1996). Increased circulating intercellular adhesion molecule-1 levels in type II diabetic patients: the possible role of metabolic control and oxidative stress. *Metabolism* 45(4), 498-501.

- Chaudhari, L., Tandon, O. P., Vaney, N., and Agarwal, N. (2003). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetics. *Indian J Physiol Pharmacol* 47(4), 441-6.
- Cheatham, B., and Kahn, C. R. (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16(2), 117-42.
- Clement, K., Viguerie, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C. A., Sicard, A., Rome, S., Benis, A., Zucker, J. D., Vidal, H., Laville, M., Barsh, G. S., Basdevant, A., Stich, V., Cancellato, R., and Langin, D. (2004). Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J* 18(14), 1657-69.
- Cohen, S. (2000). Cytokine profile data. *Immunol Today* 21(4), 199-200.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Obici, S., Scherer, P. E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108(12), 1875-81.
- Conover, C. A., Ronk, M., Lombana, F., and Powell, D. R. (1990). Structural and biological characterization of bovine insulin-like growth factor binding protein-3. *Endocrinology* 127(6), 2795-803.
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., and et coll. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334(5), 292-5.
- Coppack, S. W. (2001). Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 60(3), 349-56.
- Cordero, L., and Landon, M. B. (1993). Infant of the diabetic mother. *Clin Perinatol* 20(3), 635-48.
- Coughlan, M. T., Vervaart, P. P., Permezel, M., Georgiou, H. M., and Rice, G. E. (2004). Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 25(1), 78-84.
- Coustan, D. (1995). Diagnosis of gestational diabetes. Are new criteria needed ? . *Diabetes Reviews* 3, 614-620.
- Coustan, D. R. (1997). Gestational diabetes: a continuum of risk. *Eur J Endocrinol* 137(1), 13-4.

- Coustan, D. R., and Carpenter, M. W. (1998). The diagnosis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B5-8.
- Creely, S. J., McTernan, P. G., Kusminski, C. M., Fisher, M., Da Silva, N. F., Khanolkar, M., Evans, M., Harte, A. L., and Kumar, S. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(3), E740-7.
- Dalton, T., Shertzer, H., and Puga, A. (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39(1), 67-101.
- Damm, P., Kuhl, C., Buschard, K., Jakobsen, B. K., Svejgaard, A., Sodoyez-Goffaux, F., Shattock, M., Bottazzo, G. F., and Molsted-Pedersen, L. (1994). Prevalence and predictive value of islet cell antibodies and insulin autoantibodies in women with gestational diabetes. *Diabet Med* 11(6), 558-63.
- Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25(1), 4-7.
- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., and Garg, R. (2005). Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111(11), 1448-54.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., and Nicotera, T. (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347(8999), 444-5.
- Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, A., and Wadden, T. (1998). Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 83(8), 2907-10.
- Davenport, M. L., Clemmons, D. R., Miles, M. V., Camacho-Hubner, C., D'Ercole, A. J., and Underwood, L. E. (1990). Regulation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during rat pregnancy. *Endocrinology* 127(3), 1278-86.
- De Mattia, G., Bravi, M. C., Laurenti, O., Cassone-Faldetta, M., Armiento, A., Ferri, C., and Balsano, F. (1998). Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47(8), 993-7.
- De Mellow, J. S., and Baxter, R. C. (1988). Growth hormone-dependent insulin-like growth factor (IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 156(1), 199-204.

- De Meyts P, W. B., Christoffersen CT, Ursø B, Grønskov K, Latus LJ, Yakushiji F, Ilondo MM, Shymko RM. (1994). The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Hormone research* 42(4-5), 152-169.
- de Strasbourg, H. (2001). Le diabète de type 2. *Médecine Nucléaire-Imagerie fonctionnelle et métabolique* 25(2), 103.
- DeFronzo, R. A., and Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14(3), 173-94.
- Demple, B., and Amabile-Cuevas, C. F. (1991). Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* 67(5), 837-9.
- Desai, M., Crowther, N. J., Ozanne, S. E., Lucas, A., and Hales, C. N. (1995). Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans* 23(2), 331-5.
- Di Cianni, G., Miccoli, R., Volpe, L., Lencioni, C., Ghio, A., Giovannitti, M. G., Cuccuru, I., Pellegrini, G., Chatzianagnostou, K., Boldrini, A., and Del Prato, S. (2005). Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. *Diabet Med* 22(1), 21-5.
- Diez, J. J., and Iglesias, P. (2003). The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148(3), 293-300.
- Djrolo, F., Amoussou-Guenou, K., Zannou, D., Houinato, D., Ahouandogbo, F., and Houngbe, F. (2003). Prévalence du diabète sucré au Bénin. *Louvain médical* 122(6), 256-260.
- Dorner, G., and Plagemann, A. (1994). Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res* 26(5), 213-21.
- Dornhorst, A., Paterson, C. M., Nicholls, J. S., Wadsworth, J., Chiu, D. C., Elkeles, R. S., Johnston, D. G., and Beard, R. W. (1992). High prevalence of gestational diabetes in women from ethnic minority groups. *Diabet Med* 9(9), 820-5.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1), 47-95.
- Eckel, R. H. (1992). Insulin resistance: an adaptation for weight maintenance. *Lancet* 340(8833), 1452-3.

- Elenkov, I., Wilder, R., Bakalov, V., Link, A., Dimitrov, M., Fisher, S., Crane, M., Kanik, K., and Chrousos, G. (2001). IL-12, TNF- α , and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(10), 4933.
- embryologie.ch (2009). Contrôle du développement embryonnaire. In "Embriologie humaine", Vol.15 octobre. 2009.<http://www.embryology.ch/francais/iperiodembry/contrrole01.html>
- Enquobahrie, D. A., Williams, M. A., Qiu, C., Meller, M., and Sorensen, T. K. (2009). Global placental gene expression in gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 200(2), 206 e1-13.
- Esposito, K., Pontillo, A., Di Palo, C., Giugliano, G., Masella, M., Marfella, R., and Giugliano, D. (2003). Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 289(14), 1799-804.
- Ettinger, W. H., Jr., Sun, W. H., Binkley, N., Kouba, E., and Ershler, W. (1995). Interleukin-6 causes hypocholesterolemia in middle-aged and old rhesus monkeys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50(3), M137-40.
- Faggioni, R., Fantuzzi, G., Gabay, C., Moser, A., Dinarello, C. A., Feingold, K. R., and Grunfeld, C. (1999). Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol* 276(1 Pt 2), R136-42.
- Fasshauer, M., Klein, J., Neumann, S., Eszlinger, M., and Paschke, R. (2002). Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290(3), 1084-9.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique(Paris. 1973)*(11-12), 108-115.
- Fernandez-Real, J. M., Vendrell, J., Ricart, W., Broch, M., Gutierrez, C., Casamitjana, R., Oriola, J., and Richart, C. (2000). Polymorphism of the tumor necrosis factor-alpha receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 23(6), 831-7.
- Festa, A., Shnawa, N., Krugluger, W., Hopmeier, P., Scherthaner, G., and Haffner, S. M. (1999). Relative hypoleptinaemia in women with mild gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 16(8), 656-62.
- Fowden, A. L. (1989). The role of insulin in prenatal growth. *J Dev Physiol* 12(4), 173-82.

- Françoise, R.-M., Ed. (1998). L'INFLAMMATION. Editions Jhon Libbey Eurotext
- Edited by E. s. J. L. Eurotext. Paris.
- Friedman, J. E., Ishizuka, T., Shao, J., Huston, L., Highman, T., and Catalano, P. (1999). Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* 48(9), 1807-14.
- Friedman, J. M. (2000). Obesity in the new millennium. *Nature* 404(6778), 632-4.
- Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., Bihain, B. E., and Lodish, H. F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4), 2005-10.
- Frydryk, J., Nyholm, B., Skjaerbaek, C., Baxter, R. C., Schmitz, O., and Orskov, H. (2003). The circulating IGF system and its relationship with 24-h glucose regulation and insulin sensitivity in healthy subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 58(6), 777-84.
- Fulton, C., Richardson, A., and Sharma, S. (2006). Immune regulation in Gestational Diabetes Mellitus (GDM) patients: TLR-mediated activation or suppression. *Journal of Reproductive Immunology* 71(2), 171-172.
- Funahashi, T., Nakamura, T., Shimomura, I., Maeda, K., Kuriyama, H., Takahashi, M., Arita, Y., Kihara, S., and Matsuzawa, Y. (1999). Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med* 38(2), 202-6.
- Gabbe, S. G. (1986). Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 315(16), 1025-6.
- Gaillard, O. (2000). Hormone de croissance. *Immunoanal Biol Spéc* 15, 409-413.
- Gaillard, O. (2001). Insulin-like growth factor-I (IGF-1). *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée* 16(1), 15-17.
- Gaillard, O. (2002). Nom de l'analyte. *Immunoanalyse & Biologie Spécialisée* 17(3), 140-142.
- Gainsford, T., Willson, T. A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N. A., Alexander, W. S., and Hilton, D. J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25), 14564-8.

- Garnica, A. D., and Chan, W. Y. (1996). The role of the placenta in fetal nutrition and growth. *J Am Coll Nutr* 15(3), 206-22.
- Garvey, W. T., Maianu, L., Zhu, J. H., Hancock, J. A., and Golichowski, A. M. (1993). Multiple defects in the adipocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes. Heterogeneity in the number and a novel abnormality in subcellular localization of GLUT4 glucose transporters. *Diabetes* 42(12), 1773-85.
- Gogg, S., and Smith, U. (2002). Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha mimic the effects of insulin in human fat cells and augment downstream signaling in insulin resistance. *J Biol Chem* 277(39), 36045-51.
- Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., and Matsukuma, K. (1997). EGF receptor phosphorylation is affected by ionizing radiation. *Biochim Biophys Acta* 1358(3), 289-99.
- Grissa, O., Ategbo, J. M., Yessoufou, A., Tabka, Z., Miled, A., Jerbi, M., Dramane, K. L., Moutairou, K., Prost, J., Hichami, A., and Khan, N. A. (2007). Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia. *Transl Res* 150(3), 164-71.
- Guemouri, L., Artur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., and Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 37(11), 1932-7.
- Guerre-Millo, M. (2002). Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest* 25(10), 855-61.
- Gutteridge, J., and Halliwell, B. (1993). Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radical Research* 19(3), 141-158.
- Haddad, J. J. (2002). Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell Signal* 14(11), 879-97.
- Hadden, D. R. (1985). Geographic, ethnic, and racial variations in the incidence of gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 34 Suppl 2, 8-12.
- Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., and Friedman, J. M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269(5223), 543-6.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet* 344, 721-724.

- Halleux, C. M., Takahashi, M., Delporte, M. L., Detry, R., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., and Brichard, S. M. (2001). Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 288(5), 1102-7.
- Handwerger, S., and Freemark, M. (2000). The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(4), 343-56.
- Harris, R. B. (2000). Leptin--much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 20, 45-75.
- Heinig, J., Wilhelm, S., Müller, H., Briese, V., Bittorf, T., and Brock, J. (2000). Determination of cytokine mRNA-expression in term human placenta of patients with gestational hypertension, intrauterine growth retardation and gestational diabetes mellitus using polymerase chain reaction. *Zentralbl Gynakol* 122(8), 413.
- Hill, D. J., and Milner, R. D. (1985). Insulin as a growth factor. *Pediatr Res* 19(9), 879-86.
- Hill, D. J., Tevaarwerk, G. J., Arany, E., Kilkenny, D., Gregory, M., Langford, K. S., and Miell, J. (1995). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is present in maternal and cord serum, and in the mother is associated with a binding protein immunologically related to the FGF receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 80(6), 1822-31.
- Hoch, R. V., and Soriano, P. (2003). Roles of PDGF in animal development. *Development* 130(20), 4769-84.
- Hoeck, W. G., and Mukku, V. R. (1994). Identification of the major sites of phosphorylation in IGF binding protein-3. *J Cell Biochem* 56(2), 262-73.
- Hofmann, G. E., and Abramowicz, J. S. (1990). Epidermal growth factor (EGF) concentrations in amniotic fluid and maternal urine during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 69(3), 217-21.
- Hoggard, N., Mercer, J. G., Rayner, D. V., Moar, K., Trayhurn, P., and Williams, L. M. (1997). Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 232(2), 383-7.
- Holmgren, L., Glaser, A., Pfeifer-Ohlsson, S., and Ohlsson, R. (1991). Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression. *Development* 113(3), 749-54.
- Holt, P. (1996). Primary allergic sensitization to environmental antigens: perinatal T cell priming as a determinant of responder phenotype in adulthood. *Journal of Experimental Medicine* 183(4), 1297-1301.

- Hopkins, T. A., Ouchi, N., Shibata, R., and Walsh, K. (2007). Adiponectin actions in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 74(1), 11-8.
- Hotamisligil, G., Arner, P., Caro, J., Atkinson, R., and Spiegelman, B. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 95(5), 2409-2415.
- Hotamisligil, G., Budavari, A., Murray, D., and Spiegelman, B. (1994a). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. *J Clin Invest* 94, 1543-1549.
- Hotamisligil, G., Murray, D., Choy, L., and Spiegelman, B. (1994b). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(11), 4854-4858.
- Hotamisligil, G., Shargill, N., and Spiegelman, B. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259(5091), 87-91.
- Hotta, K., Funahashi, T., Bodkin, N. L., Ortmeier, H. K., Arita, Y., Hansen, B. C., and Matsuzawa, Y. (2001). Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 50(5), 1126-33.
- Hug, C., and Lodish, H. F. (2005). The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 5(2), 129-34.
- Humbel, R. E. (1990). Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem* 190(3), 445-62.
- Hunt, J. V., Smith, C. C., and Wolff, S. P. (1990). Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39(11), 1420-4.
- Ihle, J., Witthuhn, B., Quelle, F., Yamamoto, K., and Silvennoinen, O. (1995). Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13(1), 369-398.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115(5), 577-90.
- Jensen, D. M., Sorensen, B., Feilberg-Jorgensen, N., Westergaard, J. G., and Beck-Nielsen, H. (2000). Maternal and perinatal outcomes in 143 Danish women with gestational diabetes mellitus and 143 controls with a similar risk profile. *Diabet Med* 17(4), 281-6.

- Jimenez-Moleon, J. J., Bueno-Cavanillas, A., Luna-del-Castillo Jde, D., Garcia-Martin, M., Lardelli-Claret, P., and Galvez-Vargas, R. (2002). Impact of different levels of carbohydrate intolerance on neonatal outcomes classically associated with gestational diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 102(1), 36-41.
- Jolly, M., Sebire, N., Harris, J., Robinson, S., and Regan, L. (2000). The risks associated with pregnancy in women aged 35 years or older. *Hum Reprod* 15(11), 2433-7.
- Jolly, M. C., Sebire, N. J., Harris, J. P., Regan, L., and Robinson, S. (2003). Risk factors for macrosomia and its clinical consequences: a study of 350,311 pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 111(1), 9-14.
- Jones, J. I., D'Ercole, A. J., Camacho-Hubner, C., and Clemmons, D. R. (1991). Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17), 7481-5.
- Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26(3), 439-51.
- Kaicer, E., Blat, C., Imbenotte, J., Troalen, F., Cussenot, O., Calvo, F., and Harel, L. (1993). IGF binding protein-3 secreted by the prostate adenocarcinoma cells (PC-3): differential effect on PC-3 and normal prostate cell growth. *Growth Regul* 3(3), 180-9.
- Kajanachumpol, S., Komindr, S., and Mahaisiriyodom, A. (1997). Plasma lipid peroxide and antioxidant levels in diabetic patients. *J Med Assoc Thai* 80(6), 372-7.
- Kalkhoff, R. K., Kissebah, A. H., and Kim, H. J. (1978). Carbohydrate and lipid metabolism during normal pregnancy: relationship to gestational hormone action. *Semin Perinatol* 2(4), 291-307.
- Kamath, U., Rao, G., Raghothama, C., Rai, L., and Rao, P. (1998). Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. *Acta Paediatr* 87(6), 676-9.
- Kautzky-Willer, A., Pacini, G., Tura, A., Bieglmayer, C., Schneider, B., Ludvik, B., Prager, R., and Waldhausl, W. (2001). Increased plasma leptin in gestational diabetes. *Diabetologia* 44(2), 164-72.
- Kern, P. A., Saghizadeh, M., Ong, J. M., Bosch, R. J., Deem, R., and Simsolo, R. B. (1995). The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 95(5), 2111-9.
- Khan, N. (2006). Inflammation et immunité: implications dans l'obésité et le diabète de type 2. *OCL. Oléagineux, corps gras, lipides* 13(5), 343-351.

- Khan, N. A., Yessoufou, A., Kim, M., and Hichami, A. (2006). N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. *J Autoimmun* 26(4), 268-77.
- Khrouf, N., Tabka, Z., Becher, S., Miled, S., and Hamza, B. (1983). Fetal macrosomia and the study of risk factors in maternal diabetes. *Archives françaises de pédiatrie* 40(10), 815.
- Kim, M., Maachi, M., Capeau, J., and Bastard, J. (2006). Adiponectin and the metabolic syndrome. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 21(1), 1-7.
- Kinalska, M., Sledziewski, A., Telejko, B., Kowalska, I., Kretowski, A., Zarzycki, W., and Kinalska, I. (2001). Lipid peroxidation, antioxidant defence and acid-base status in cord blood at birth: the influence of diabetes. *Horm Metab Res* 33(4), 227-31.
- King, H. (1996). Le diabète sucré. . *OMS Aide mémoire* N° 135(1-4).
- Kjos, S. L., and Buchanan, T. A. (1999). Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341(23), 1749-56.
- Kjos, S. L., Buchanan, T. A., Greenspoon, J. S., Montoro, M., Bernstein, G. S., and Mestman, J. H. (1990). Gestational diabetes mellitus: the prevalence of glucose intolerance and diabetes mellitus in the first two months post partum. *Am J Obstet Gynecol* 163(1 Pt 1), 93-8.
- Kjos, S. L., Peters, R. K., Xiang, A., Henry, O. A., Montoro, M., and Buchanan, T. A. (1995). Predicting future diabetes in Latino women with gestational diabetes. Utility of early postpartum glucose tolerance testing. *Diabetes* 44(5), 586-91.
- Kjos, S. L., Peters, R. K., Xiang, A., Schaefer, U., and Buchanan, T. A. (1998). Hormonal choices after gestational diabetes. Subsequent pregnancy, contraception, and hormone replacement. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B50-7.
- Kniss, D., Shubert, P., Zimmerman, P., Landon, M., and Gabbe, S. (1994). Insulinlike growth factors: their regulation of glucose and amino acid transport in placental trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi. *Journal of reproductive medicine* 39(4), 249-256.
- Knopp, R. H., Magee, M. S., Walden, C. E., Bonet, B., and Benedetti, T. J. (1992). Prediction of infant birth weight by GDM screening tests. Importance of plasma triglyceride. *Diabetes Care* 15(11), 1605-13.
- Knowler, W., Barrett-Connor, E., Fowler, S., Hamman, R., Lachin, J., Walker, E., and Nathan, D. (2002). Diabetes Prevention Program Research Group 2002 Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346, 393-403.

- Kopp, H. P., Kopp, C. W., Festa, A., Krzyzanowska, K., Kriwanek, S., Minar, E., Roka, R., and Schernthaner, G. (2003). Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(6), 1042-7.
- Kuhl, C. (1998). Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B19-26.
- La Cava, A., and Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 4(5), 371-9.
- Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., and Clement, K. (2007). Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 148(2), 868-77.
- Lacroix, B. (2008). Améliorer le fonctionnement des mitochondries. In "Nutra news", Vol. Avril 2008, pp. 10-13.
- Lacroix, M. C., Devinoy, E., Cassy, S., Servely, J. L., Vidaud, M., and Kann, G. (1999). Expression of growth hormone and its receptor in the placental and feto-maternal environment during early pregnancy in sheep. *Endocrinology* 140(12), 5587-97.
- Lafontan, M., and Viguerie, N. (2006). Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol* 6(6), 580-5.
- Lahlou, N., and Roger, M. (1996). Mesures de l'hormone de croissance, des IGFs et de leurs protéines porteuses. *Méd Théor* 2(05 hors sdrie), 54-65.
- Lahmidi, H. (2002). Thèse de Doctorat d'Etat de Médecine, Tunis. Faculté de médecine de Tunis., Tunis.
- Lam, K. S., Li, D. F., Lauder, I. J., Lee, C. P., Kung, A. W., and Ma, J. T. (1991). Prediction of persistent carbohydrate intolerance in patients with gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 12(3), 181-6.
- Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 11(2), 118-24.
- Landon, M. B., and Gabbe, S. G. (1985). Antepartum fetal surveillance in gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 34 Suppl 2, 50-4.

- Lapolla, A., Dalfra, M. G., Sanzari, M., Fedele, D., Betterle, C., Masin, M., Zanchetta, R., Faggian, D., Masotti, M., Nucera, V., and Plebani, M. (2005). Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine* 31(4), 280-7.
- Lauszus, F. F., Klebe, J. G., and Flyvbjerg, A. (2001). Macrosomia associated with maternal serum insulin-like growth factor-I and -II in diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* 97(5 Pt 1), 734-41.
- Lebouc, Y. (1996). Biologie des IGF. . *Med Théor* 2(05 hors série), 22-25.
- Lee, P. D., Conover, C. A., and Powell, D. R. (1993). Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. *Proc Soc Exp Biol Med* 204(1), 4-29.
- Lee, Z. S., Chan, J. C., Yeung, V. T., Chow, C. C., Lau, M. S., Ko, G. T., Li, J. K., Cockram, C. S., and Critchley, J. A. (1999). Plasma insulin, growth hormone, cortisol, and central obesity among young Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22(9), 1450-7.
- Leinonen, J., Lehtimäki, T., Toyokuni, S., Okada, K., Tanaka, T., Hiai, H., Ochi, H., Laippala, P., Rantalaiho, V., Wirta, O., Pasternack, A., and Alho, H. (1997). New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 417(1), 150-2.
- Li, R. H., Yu, M. M., Cheung, A. N., and Wong, Y. F. (2004). Expression of leptin and leptin receptors in gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol* 95(2), 299-306.
- Li, Z., Soloski, M. J., and Diehl, A. M. (2005). Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 42(4), 880-5.
- Lihn, A. S., Richelsen, B., Pedersen, S. B., Haugaard, S. B., Rathje, G. S., Madsbad, S., and Andersen, O. (2003). Increased expression of TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(5), E1072-80.
- Lin, Y., Xie, M., Chen, Y., Di, J., and Zeng, Y. (2006). Preterm delivery induced by LPS in syngeneically impregnated BALB/c and NOD/SCID mice. *J Reprod Immunol* 71(2), 87-101.
- Lindsay, R. S., Westgate, J. A., Beattie, J., Pattison, N. S., Gamble, G., Mildenhall, L. F., Breier, B. H., and Johnstone, F. D. (2007). Inverse changes in fetal insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 in association with higher birth weight in maternal diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66(3), 322-8.

- Liu, L., Delbe, J., Blat, C., Zapf, J., and Harel, L. (1992). Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3), an inhibitor of serum growth factors other than IGF-I and -II. *J Cell Physiol* 153(1), 15-21.
- Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., Lane, M. D., and Diehl, A. M. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 12(1), 57-65.
- Loukovaara, M., Leinonen, P., Teramo, K., Andersson, S., Alfthan, H., and Stenman, U. H. (2004). Diabetic pregnancy associated with increased epidermal growth factor in cord serum at term. *Obstet Gynecol* 103(2), 240-4.
- MacFarlane, C., and Tsakalakos, N. (1988). The extended Pedersen hypothesis. *Clinical physiology and biochemistry* 6(2), 68.
- Magee, M. S., Walden, C. E., Benedetti, T. J., and Knopp, R. H. (1993). Influence of diagnostic criteria on the incidence of gestational diabetes and perinatal morbidity. *JAMA* 269(5), 609-15.
- Major, C. A., deVeciana, M., Weeks, J., and Morgan, M. A. (1998). Recurrence of gestational diabetes: who is at risk? *Am J Obstet Gynecol* 179(4), 1038-42.
- Makimattila, S., Liu, M. L., Vakkilainen, J., Schlenzka, A., Lahdenpera, S., Syvanne, M., Mantysaari, M., Summanen, P., Bergholm, R., Taskinen, M. R., and Yki-Jarvinen, H. (1999). Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants. *Diabetes Care* 22(6), 973-81.
- Masuyama, H., Hiramatsu, Y., and Kudo, T. (1996). Effect of epidermal growth factor on placental amino acid transport and regulation of epidermal growth factor receptor expression of hepatocyte in rat. *J Perinat Med* 24(3), 213-20.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., and Mori, T. (1998). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Obstetrical & Gynecological Survey* 53(3), 156.
- Matarese, G., La Cava, A., Sanna, V., Lord, G. M., Lechler, R. I., Fontana, S., and Zappacosta, S. (2002). Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol* 23(4), 182-7.
- Matsuzawa, Y. (2006). The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 580(12), 2917-21.

- Mattioli, B., Straface, E., Quaranta, M. G., Giordani, L., and Viora, M. (2005). Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 174(11), 6820-8.
- Maxwell, S. R., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M. A., Thorpe, G. H., Jones, A. F., and Barnett, A. H. (1997a). Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 27(6), 484-90.
- Maxwell, S. R., Thomason, H., Sandler, D., LeGuen, C., Baxter, M. A., Thorpe, G. H., Jones, A. F., and Barnett, A. H. (1997b). Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 34 (Pt 6), 638-44.
- McDermott, M. F. (2001). TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47(4), 619-35.
- McLachlan, K., O'neal, D., Jenkins, A., and Alford, F. (2006). Do adiponectin, TNFalpha, leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy. *Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. Diabetes Metab Res Rev* 22(2), 131-138.
- Meda, N., Soula, G., Dabis, F., Cousens, S., Some, A., Mertens, T., and Salamon, R. (1995). [Risk factors in prematurity and intrauterine growth retardation in Burkina Faso]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 43(3), 215-24.
- Meller, M., Qiu, C., Vadachkoria, S., Abetew, D. F., Luthy, D. A., and Williams, M. A. (2006). Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. *Physiol Res* 55(5), 501-12.
- Merzouk, H., and Khan, N. A. (2003). Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects? *Clin Sci (Lond)* 105(5), 519-29.
- Merzouk, H., Madani, S., Hichami, A., Prost, J., Moutairou, K., Belleville, J., and Khan, N. A. (2002). Impaired lipoprotein metabolism in obese offspring of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lipids* 37(8), 773-81.
- Merzouk, H., Madani, S., Prost, J., Loukidi, B., Meghelli-Bouchenak, M., and Belleville, J. (1999). Changes in serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions at birth and after 1 month of life in macrosomic infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Eur J Pediatr* 158(9), 750-6.

- Merzouk, S., Hichami, A., Madani, S., Merzouk, H., Berrouiguet, A. Y., Prost, J., Moutairou, K., Chabane-Sari, N., and Khan, N. A. (2003). Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 22(1), 15-27.
- Meshari, A. A., De Silva, S., and Rahman, I. (1990). Fetal macrosomia--maternal risks and fetal outcome. *Int J Gynaecol Obstet* 32(3), 215-22.
- Metzger, B. E. (1991). Biphasic effects of maternal metabolism on fetal growth. Quintessential expression of fuel-mediated teratogenesis. *Diabetes* 40 Suppl 2, 99-105.
- Michalakis, K., Williams, C. J., Mitsiades, N., Blakeman, J., Balafouta-Tselenis, S., Giannopoulos, A., and Mantzoros, C. S. (2007). Serum adiponectin concentrations and tissue expression of adiponectin receptors are reduced in patients with prostate cancer: a case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(2), 308-13.
- Mills, J. L., Jovanovic, L., Knopp, R., Aarons, J., Conley, M., Park, E., Lee, Y. J., Holmes, L., Simpson, J. L., and Metzger, B. (1998). Physiological reduction in fasting plasma glucose concentration in the first trimester of normal pregnancy: the diabetes in early pregnancy study. *Metabolism* 47(9), 1140-4.
- Mirlesse, V., Frankenne, F., Alsat, E., Poncelet, M., Hennen, G., and Evain-Brion, D. (1993). Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 34(4), 439-42.
- Misra, M., Bredella, M. A., Tsai, P., Mendes, N., Miller, K. K., and Klibanski, A. (2008). Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(2), E385-92.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., Klein, S., and Coppack, S. W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82(12), 4196-200.
- Mohanty, P., Hamouda, W., Garg, R., Aljada, A., Ghanim, H., and Dandona, P. (2000). Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 85(8), 2970-3.
- Montague, C. T., Prins, J. B., Sanders, L., Zhang, J., Sewter, C. P., Digby, J., Byrne, C. D., and O'Rahilly, S. (1998). Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47(9), 1384-91.

- Morris, A. M., Sennello, J. A., Fayad, R. A., Eckel, R. H., Dinarello, C. A., and Fantuzzi, G. (2006). T cell-mediated hepatic inflammation modulates adiponectin levels in mice: role of tumor necrosis factor alpha. *Metabolism* 55(4), 555-9.
- Moses, R. G. (1996). The recurrence rate of gestational diabetes in subsequent pregnancies. *Diabetes Care* 19(12), 1348-50.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136(7), 2348-57.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-73.
- Muller, A., Schott-Ohly, P., Dohle, C., and Gleichmann, H. (2002). Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology* 205(1), 35-50.
- Murphy, V. E., Smith, R., Giles, W. B., and Clifton, V. L. (2006). Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr Rev* 27(2), 141-69.
- Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., McCarthy, S., Betteridge, D., and Wolff, S. (1995). Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 44(9), 1054-1058.
- Nystrom, H. C., Lindblom, P., Wickman, A., Andersson, I., Norlin, J., Faldt, J., Lindahl, P., Skott, O., Bjarnegard, M., Fitzgerald, S. M., Caidahl, K., Gan, L. M., Betsholtz, C., and Bergstrom, G. (2006). Platelet-derived growth factor B retention is essential for development of normal structure and function of conduit vessels and capillaries. *Cardiovasc Res* 71(3), 557-65.
- O'Sullivan, J. B., Charles, D., Mahan, C. M., and Dandrow, R. V. (1973). Gestational diabetes and perinatal mortality rate. *Am J Obstet Gynecol* 116(7), 901-4.
- Onuma, M., Bub, J. D., Rummel, T. L., and Iwamoto, Y. (2003). Prostate cancer cell-adipocyte interaction: leptin mediates androgen-independent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 278(43), 42660-7.
- Opara, E. C., Abdel-Rahman, E., Soliman, S., Kamel, W. A., Souka, S., Lowe, J. E., and Abdel-Aleem, S. (1999). Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism* 48(11), 1414-7.

- Orhan, H., Onderoglu, L., Yucel, A., and Sahin, G. (2003). Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 267(4), 189-95.
- Osmond, D. T., Nolan, C. J., King, R. G., Brennecke, S. P., and Gude, N. M. (2000). Effects of gestational diabetes on human placental glucose uptake, transfer, and utilisation. *Diabetologia* 43(5), 576-82.
- Pacifico, L., Di Renzo, L., Anania, C., Osborn, J. F., Ippoliti, F., Schiavo, E., and Chiesa, C. (2006). Increased T-helper interferon-gamma-secreting cells in obese children. *Eur J Endocrinol* 154(5), 691-7.
- Palacio, A., Lopez, M., Perez-Bravo, F., Monkeberg, F., and Schlesinger, L. (2002). Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab* 87(7), 3040-6.
- Palinski, W., and Napoli, C. (2002). The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *FASEB J* 16(11), 1348-60.
- Paolisso, G., Balbi, V., Volpe, C., Varricchio, G., Gambardella, A., Saccomanno, F., Ammendola, S., Varricchio, M., and D'Onofrio, F. (1995). Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin dependent diabetics. *J Am Coll Nutr* 14(4), 387-92.
- Paolisso, G., D'Amore, A., Balbi, V., Volpe, C., Galzerano, D., Giugliano, D., Sgambato, S., Varricchio, M., and D'Onofrio, F. (1994a). Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol* 266(2 Pt 1), E261-8.
- Paolisso, G., D'Amore, A., Giugliano, D., Ceriello, A., Varricchio, M., and D'Onofrio, F. (1993). Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 57(5), 650-6.
- Paolisso, G., D'Amore, A., Volpe, C., Balbi, V., Saccomanno, F., Galzerano, D., Giugliano, D., Varricchio, M., and D'Onofrio, F. (1994b). Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism* 43(11), 1426-9.
- Papathanassoglou, E., El-Haschimi, K., Li, X. C., Matarese, G., Strom, T., and Mantzoros, C. (2006). Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *J Immunol* 176(12), 7745-52.

- Patane, G., Piro, S., Rabuazzo, A. M., Anello, M., Vigneri, R., and Purrello, F. (2000). Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49(5), 735-40.
- Persson, B., and Hanson, U. (1998). Neonatal morbidities in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B79-84.
- Peters, R. K., Kjos, S. L., Xiang, A., and Buchanan, T. A. (1996). Long-term diabetogenic effect of single pregnancy in women with previous gestational diabetes mellitus. *Lancet* 347(8996), 227-30.
- Pettitt, D. J., Aleck, K. A., Baird, H. R., Carraher, M. J., Bennett, P. H., and Knowler, W. C. (1988). Congenital susceptibility to NIDDM. Role of intrauterine environment. *Diabetes* 37(5), 622-8.
- Pettitt, D. J., Baird, H. R., Aleck, K. A., Bennett, P. H., and Knowler, W. C. (1983). Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. *N Engl J Med* 308(5), 242-5.
- Peuchant, E., Brun, J., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M., Daniel, J., Leng, J., and Gin, H. (2004). Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clinical biochemistry* 37(4), 293-298.
- Philipson, E. H., and Super, D. M. (1989). Gestational diabetes mellitus: does it recur in subsequent pregnancy? *Am J Obstet Gynecol* 160(6), 1324-9; discussion 1329-31.
- Pittas, A. G., Joseph, N. A., and Greenberg, A. S. (2004). Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89(2), 447-52.
- Plagemann, A., Harder, T., Kohlhoff, R., Rohde, W., and Dorner, G. (1997). Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia* 40(9), 1094-100.
- Pond, C. M. (2005). Adipose tissue and the immune system. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(1), 17-30.
- Porcellati, F., Pampanelli, S., Rossetti, P., Cordoni, C., Marzotti, S., Scionti, L., Bolli, G. B., and Fanelli, C. G. (2003). Counterregulatory hormone and symptom responses to insulin-induced hypoglycemia in the postprandial state in humans. *Diabetes* 52(11), 2774-83.

- Postel-Vinay, M. (1996). Mécanisme d'action de l'hormone de croissance. *Méd Thér* 05 hors série (2), 16-21.
- Pribylova, H., and Dvorakova, L. (1996). Long-term prognosis of infants of diabetic mothers. Relationship between metabolic disorders in newborns and adult offspring. *Acta Diabetol* 33(1), 30-4.
- Rabinovitch, A. (1994). Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43(5), 613-21.
- Radaelli, T., Varastehpour, A., Catalano, P., and Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 52(12), 2951-8.
- Rajdl, D., Racek, J., Steinerova, A., Novotny, Z., Stozicky, F., Trefil, L., and Siala, K. (2005). Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. *Physiological research* 54(4), 429.
- Rayner, D. V., and Trayhurn, P. (2001). Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med* 79(1), 8-20.
- Rehman, A., Nourooz-Zadeh, J., Moller, W., Tritschler, H., Pereira, P., and Halliwell, B. (1999). Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett* 448(1), 120-2.
- Rengarajan, J., Szabo, S. J., and Glimcher, L. H. (2000). Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21(10), 479-83.
- Roth, S., Abernathy, M. P., Lee, W. H., Pratt, L., Denne, S., Golichowski, A., and Pescovitz, O. H. (1996). Insulin-like growth factors I and II peptide and messenger RNA levels in macrosomic infants of diabetic pregnancies. *J Soc Gynecol Investig* 3(2), 78-84.
- Ruan, H., and Lodish, H. F. (2004). Regulation of insulin sensitivity by adipose tissue-derived hormones and inflammatory cytokines. *Curr Opin Lipidol* 15(3), 297-302.
- Ruiz, C., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R., and Lagarda, M. J. (1999). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 59(2), 99-105.
- Sacks, D. A. (1993). Fetal macrosomia and gestational diabetes: what's the problem? *Obstet Gynecol* 81(5 (Pt 1)), 775-81.

- Sacks, D. A., Greenspoon, J. S., Abu-Fadil, S., Henry, H. M., Wolde-Tsadik, G., and Yao, J. F. (1995). Toward universal criteria for gestational diabetes: the 75-gram glucose tolerance test in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 172(2 Pt 1), 607-14.
- Samad, F., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Pandey, M., Hotamisligil, G. S., and Loskutoff, D. J. (1999). Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12), 6902-7.
- Santini, S. A., Marra, G., Giardina, B., Cotroneo, P., Mordente, A., Martorana, G. E., Manto, A., and Ghirlanda, G. (1997). Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 46(11), 1853-8.
- Sartipy, P., and Loskutoff, D. J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12), 7265-70.
- Schaefer, U. M., Songster, G., Xiang, A., Berkowitz, K., Buchanan, T. A., and Kjos, S. L. (1997). Congenital malformations in offspring of women with hyperglycemia first detected during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 177(5), 1165-71.
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270(45), 26746-9.
- Schobitz, B., de Kloet, E. R., Sutanto, W., and Holsboer, F. (1993). Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 5(11), 1426-35.
- Schwartz, R., and Teramo, K. A. (2000). Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn. *Semin Perinatol* 24(2), 120-35.
- Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., and Mooney, R. A. (2002). Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51(12), 3391-9.
- Sermer, M., Naylor, C. D., Farine, D., Kenshole, A. B., Ritchie, J. W., Gare, D. J., Cohen, H. R., McArthur, K., Holzappel, S., and Biringer, A. (1998). The Toronto Tri-Hospital Gestational Diabetes Project. A preliminary review. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B33-42.
- Simmons, D., and Breier, B. (2002). Fetal overnutrition in Polynesian pregnancies and in gestational diabetes may lead to dysregulation of the adipoinsular axis in offspring. *Diabetes Care* 25(9), 1539.
- Sinclair, A. (1993). Free radical mechanisms and vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Rev* 2(2), 7-10.

- Sivan, E., Whittaker, P. G., Sinha, D., Homko, C. J., Lin, M., Reece, E. A., and Boden, G. (1998). Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *Am J Obstet Gynecol* 179(5), 1128-32.
- Smirnoff, N. (2001). L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm* 61, 241-66.
- Snyder, J., Gray-Donald, K., and Koski, K. G. (1994). Predictors of infant birth weight in gestational diabetes. *Am J Clin Nutr* 59(6), 1409-14.
- Spellacy, W. N., Miller, S., Winegar, A., and Peterson, P. Q. (1985). Macrosomia--maternal characteristics and infant complications. *Obstet Gynecol* 66(2), 158-61.
- Staiger, K., Stefan, N., Staiger, H., Brendel, M. D., Brandhorst, D., Bretzel, R. G., Machicao, F., Kellerer, M., Stumvoll, M., Fritsche, A., and Haring, H. U. (2005). Adiponectin is functionally active in human islets but does not affect insulin secretory function or beta-cell lipoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90(12), 6707-13.
- Statement., A. D. A. C. (1999). *Diabetes Care* 22 (suppl 1), S61-S74.
- Stefan, N., and Stumvoll, M. (2002). Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res* 34(9), 469-74.
- Stefan, N., Vozarova, B., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Weyer, C., Lindsay, R. S., Youngren, J. F., Havel, P. J., Pratley, R. E., Bogardus, C., and Tataranni, P. A. (2002). Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 51(6), 1884-8.
- Stephens, J., and Pilch, P. (1995). The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. *Endocr Rev* 16(4), 529.
- Sternberg, E. M., Chrousos, G. P., Wilder, R. L., and Gold, P. W. (1992). The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 117(10), 854-66.
- Stevenson, D. K., Hopper, A. O., Cohen, R. S., Bucalo, L. R., Kerner, J. A., and Sunshine, P. (1982). Macrosomia: causes and consequences. *J Pediatr* 100(4), 515-20.
- Sundaram, R. K., Bhaskar, A., Vijayalingam, S., Viswanathan, M., Mohan, R., and Shanmugasundaram, K. R. (1996). Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond)* 90(4), 255-60.

- Tallarigo, L., Giampietro, O., Penno, G., Miccoli, R., Gregori, G., and Navalesi, R. (1986). Relation of glucose tolerance to complications of pregnancy in nondiabetic women. *N Engl J Med* 315(16), 989-92.
- Tchobroutsky, G. (1987). Diabète sucré, in: *Traité de Médecine. Flammarion Médecine Science, Paris.*
- Telci, A., Cakatay, U., Salman, S., Satman, I., and Sivas, A. (2000). Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 50(3), 213-23.
- Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Davit-Spraul, A., Conti, M., and Legrand, A. (2000). Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3(5), 373-84.
- Thivolet, C., Nicolino, M., Monbeig, S., Estour, B., Halimi, S., Robert, M., Orgiazzi, J., and Chatelain, P. (2002). Combination of autoantibody markers and risk for development of type 1 diabetes: results from a large french cohort of family members. *Diabetes Metab* 28(4 Pt 1), 279-85.
- Thomas, T. (2004). The complex effects of leptin on bone metabolism through multiple pathways. *Curr Opin Pharmacol* 4(3), 295-300.
- Thornalley, P. J., McLellan, A. C., Lo, T. W., Benn, J., and Sonksen, P. H. (1996). Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 91(5), 575-82.
- Toescu, V., Nuttall, S. L., Martin, U., Nightingale, P., Kendall, M. J., Brydon, P., and Dunne, F. (2004). Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci (Lond)* 106(1), 93-8.
- Torgerson, J. S., Hauptman, J., Boldrin, M. N., and Sjostrom, L. (2004). XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 27(1), 155-61.
- Trayhurn, P., and Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92(3), 347-55.
- Tsai, P., Yu, C., Hsu, S., Lee, Y., Huang, I., Ho, S., and Chu, C. (2005). Maternal plasma adiponectin concentrations at 24 to 31 weeks of gestation: negative association with gestational diabetes mellitus. *Nutrition* 21(11-12), 1095-1099.

- Tsigos, C., Papanicolaou, D. A., Kyrou, I., Defensor, R., Mitsiadis, C. S., and Chrousos, G. P. (1997). Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 82(12), 4167-70.
- Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J. G., Valle, T. T., Hamalainen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., Salminen, V., and Uusitupa, M. (2001). Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344(18), 1343-50.
- Vadlamudi, S., Kalhan, S. C., and Patel, M. S. (1995). Persistence of metabolic consequences in the progeny of rats fed a HC formula in their early postnatal life. *Am J Physiol* 269(4 Pt 1), E731-8.
- Vella, A., Service, F. J., and O'Brien, P. C. (2003). Glucose counterregulatory hormones in the 72-hour fast. *Endocr Pract* 9(2), 115-8.
- Velussi, M., Cernigoi, A. M., De Monte, A., Dapas, F., Caffau, C., and Zilli, M. (1997). Long-term (12 months) treatment with an antioxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J Hepatol* 26(4), 871-9.
- Verier-Mine, O., and Timsit, J. (1997). [Which definition(s) of gestational diabetes should one choose?]. *Diabetes Metab* 23 Suppl 5, 15-6.
- Verwaerde, C., Delanoye, A., Macia, L., Tailleux, A., and Wolowczuk, I. (2006). Influence of high-fat feeding on both naive and antigen-experienced T-cell immune response in DO10.11 mice. *Scand J Immunol* 64(5), 457-66.
- Viardot, A., Grey, S. T., Mackay, F., and Chisholm, D. (2007). Potential antiinflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells toward a T helper 2 phenotype. *Endocrinology* 148(1), 346-53.
- Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E., and Coqueret, O. (2006). The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol Chem* 281(46), 34742-50.
- Vijayalingam, S., Parthiban, A., Shanmugasundaram, K. R., and Mohan, V. (1996). Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 13(8), 715-9.
- Villaudy, J., Delbe, J., Blat, C., Desauty, G., Golde, A., and Harel, L. (1991). An IGF binding protein is an inhibitor of FGF stimulation. *J Cell Physiol* 149(3), 492-6.

- Volk, T., Döpfner, U., Schmutzler, M., Rimpau, S., Schnitzler, H., Konertz, W., Hoeflich, C., Döcke, W., Spies, C., and Volk, H. (2003). Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. *Cytokine* 24(6), 237-243.
- Wallenius, K., Wallenius, V., Sunter, D., Dickson, S. L., and Jansson, J. O. (2002). Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1), 560-5.
- Wasserman, W. W., and Fahl, W. E. (1997). Functional antioxidant responsive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10), 5361-6.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112(12), 1796-808.
- Weiss, R., Dufour, S., Groszmann, A., Petersen, K., Dziura, J., Taksali, S. E., Shulman, G., and Caprio, S. (2003). Low adiponectin levels in adolescent obesity: a marker of increased intramyocellular lipid accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 88(5), 2014-8.
- Westgate, J. A., Lindsay, R. S., Beattie, J., Pattison, N. S., Gamble, G., Mildenhall, L. F., Breier, B. H., and Johnstone, F. D. (2006). Hyperinsulinemia in cord blood in mothers with type 2 diabetes and gestational diabetes mellitus in New Zealand. *Diabetes Care* 29(6), 1345-50.
- White, R. M., Nissley, S. P., Moses, A. C., Rechler, M. M., and Johnsonbaugh, R. E. (1981). The growth hormone dependence of a somatomedin-binding protein in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 53(1), 49-57.
- Whitehead, J. P., Richards, A. A., Hickman, I. J., Macdonald, G. A., and Prins, J. B. (2006). Adiponectin--a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab* 8(3), 264-80.
- Wierusz-Wysocka, B., Wysocki, H., Byks, H., Zozulinska, D., Wykretowicz, A., and Kazmierczak, M. (1995). Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 27(3), 193-7.
- Will, J. C., and Byers, T. (1996). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? *Nutr Rev* 54(7), 193-202.
- Winkler, G., Cseh, K., Baranyi, E., Melczer, Z., Speer, G., Hajos, P., Salamon, F., Turi, Z., Kovacs, M., Vargha, P., and Karadi, I. (2002). Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 56(2), 93-9.

- Wood, S., Rao, T., and Frey, A. (1999). Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. *Cellular Immunology* 192(1), 1-12.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., Tobe, K., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., and Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7(8), 941-6.
- Yan-Jun, L., Tsushima, T., Minei, S., Sanaka, M., Nagashima, T., Yanagisawa, K., and Omori, Y. (1996a). Insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins (IGFBP-1, -2 and -3) in diabetic pregnancy: relationship to macrosomia. *Endocr J* 43(2), 221-31.
- Yan-Jun, L., Tsushima, T., Onoda, N., Minei, S., Sanaka, M., Nagashima, T., Yanagisawa, K., and Omori, Y. (1996b). Expression of messenger RNA of insulin-like growth factors(IGFs) and IGF binding proteins (IGFBP 1-6) in placenta of normal and diabetic pregnancy., Vol. 43. Japan Endocrine Society.
- Yang, W. S., Lee, W. J., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C. L., Chen, C. L., Tai, T. Y., and Chuang, L. M. (2001). Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 86(8), 3815-9.
- Yessoufou, A., Hichami, A., Besnard, P., Moutairou, K., and Khan, N. (2006). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {alpha} Deficiency Increases the Risk of Maternal Abortion and Neonatal Mortality in Murine Pregnancy with or without Diabetes Mellitus: Modulation of T Cell Differentiation. *Endocrinology* 147(9), 4410.
- Yessoufou, A., Moutairou, K., Girard, A., Fatoke, M., Prost, J., Ahissou, H., Djrolo, F., Avode, G., Amoussou-Guenou, D., Hichami, A., and Khan, N. A. (2005). Antioxidant status in alcohol-related diabetes mellitus in Beninese subjects. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51 Suppl, OL849-58.
- Yoshida, K., Hirokawa, J., Tagami, S., Kawakami, Y., Urata, Y., and Kondo, T. (1995). Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 38(2), 201-10.
- Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., Kawamura, M., Takemura, M., Kakui, K., Ogawa, Y., and Fujii, S. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 1(6), 371-8.
- Zaken, V., Kohen, R., and Ornoy, A. (2001). Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 64(1), 33-44.

- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505), 425-32.
- Zhuang, D., Pu, Q., Ceacareanu, B., Chang, Y., Dixit, M., and Hassid, A. (2008). Chronic insulin treatment amplifies PDGF-induced motility in differentiated aortic smooth muscle cells by suppressing the expression and function of PTP1B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(1), H163-73.
- Zollers, W. G., Jr., Babischkin, J. S., Pepe, G. J., and Albrecht, E. D. (2001). Developmental regulation of placental insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein-1 and -2 messenger RNA expression during primate pregnancy. *Biol Reprod* 65(4), 1208-14.