THESE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole doctorale de Physiologie et Physiopathologie Thérapeutique (ED 394)

Présentée par

Lyvianne DECOURTYE

Impact de la nutrition périnatale sur la mise en place de l'axe somatotrope

Directeur de thèse : Pr. Yves LE BOUC

Co-Directeur de thèse : Dr. Laurent KAPPELER

Soutenue le 20 septembre 2016

Devant le jury composé de :

Pr. Serge AMSELEM	Président du jury
Dr. Virginie TOLLE	Rapporteur
Dr. Xavier BONNEFONT	Rapporteur
Dr. Patricia GASPAR	Examinateur
Dr. Sonia GAREL	Examinateur
Dr. Jacques EPELBAUM	Examinateur

« L'homme n'est rien d'autre que son projet,

Il n'existe que dans la mesure où il se réalise,

Il n'est donc rien d'autre que l'ensemble de ses actes,

Rien d'autre que sa vie »

Jean-Paul Sartre

*Pour **ma famille** qui m'a toujours soutenue, qui a cru en moi avant que je n'émette mon premier mot et qui me voit toujours comme leur bébé même à 26 ans (et demi). Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions et surtout à mes nombreux doutes. Vous me manquez chaque jour depuis que j'ai pris mon envol…*

*Pour **ma sœur**, mon modèle, merci d'être aussi exceptionnelle, je me suis souvent vantée à l'école d'avoir une grande sœur et je pourrais encore le faire tous les jours, tellement j'en suis fière ! Tu es tout simplement indispensable à ma vie. Et bien-sûr merci à **mon beau-frère** et à **mes nièces** pour avoir contribué à mon bonheur…*

*Pour **mon homme** qui est essentiel et nécessaire à ma vie. Merci pour ton soutien durant ces 4 années de thèse, pour ces fous rires après de longues journées, pour t'être occupé de moi dans les mauvais jours et pour m'avoir écoutée parler de mes problèmes de western blot malgré ton incompréhension. Tu es l'homme le plus généreux, attentionné, gentil, drôle, intelligent et exaspérant que j'ai rencontré… bref tu es mon idéal, merci pour tout, tout simplement…*

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Merci au ***Pr. Serge Amsellem*** *pour avoir accepté d'être membre du jury, merci au* ***Dr. Tolle Virginie*** *et au* ***Dr. Bonnefont Xavier*** *pour leur gentillesse et pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. Merci au* ***Dr. Patricia Gaspar,*** *au* ***Dr. Sonia Garel*** *et au* ***Dr. Jacques Epelbaum*** *d'avoir accepté de lire ce manuscrit, d'assister à cette soutenance et d'en être examinateur.*

Je remercie le ***Pr. Bruno Fève*** *pour m'avoir acceptée dans son centre de recherche et pour son enthousiasme lors des lundis de Saint-Antoine.*

Je remercie le ***Pr. Yves Le Bouc*** *pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, merci pour ses conseils, pour ces nombreux débats sur LY/PD et pour son impressionnante mémoire, j'espère un jour réussir à atteindre 1/100ème de son intelligence!*

Je remercie le ***Dr. Laurent Kappeler*** *pour tout ! Tu as été disponible pour moi tout au long de ma thèse, je pense que je n'aurais pas pu souhaiter meilleur encadrant. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton soutien. Je te le dis ici à la fin de ma thèse mais merci pour tes nombreux « pourquoi » qui m'ont accompagnée et fait progresser même s'ils m'ont exacerbée la plupart du temps! Comme je te l'ai souvent dit je suis arrivée enfant et je repars adulte (quoi que fin d'adolescence ?).*

Merci à ***Sarah Saget*** *surnommée par mes soins Pioupiou, pour avoir été mon pilier durant ces années de thèse. Je pense que je suis extrêmement chanceuse d'avoir pu partager 2 ans de ma thèse avec toi, tu as été ma confidente et tu es devenue rapidement une amie et une personne extrêmement importante pour moi. On te taquine souvent en te disant que tu es méchante mais j'ai rarement rencontré quelqu'un avec autant le cœur sur la main. Tu as*

rempli mes journées de joie, de rire, de potinS et de soutien et je pense que je ne te remercierai jamais assez d'avoir illuminé mon quotidien. Ce qui va me manquer le plus de ma thèse ? que tu ne puisses plus faire partie de ce quotidien…

Merci à ***Maud Clemessy*** *d'avoir été là pour moi pendant cette thèse ! Merci pour ta gentillesse, ton dynamisme et ton soutien. Grâce à ces années de thèse je pourrais te définir comme une incroyable maman avec une immense gentillesse accompagnée d'un caractère bien trempé ! Tu m'as appris énormément de choses que ce soit d'un point de vue professionnel mais tu m'as également permis de grandir, même si nos collections de tsum tsum sur nos bureaux nous maintiennent en enfance ! J'espère sincèrement avoir la chance de retrouver une collègue aussi gentille que toi, même si j'en doute !*

Merci à ***Marie-Pierre Belot*** *d'avoir participé à quelques années de ma thèse ! Je regrette seulement qui tu n'aies pas pu nous accompagner jusqu'au bout ! Ta jovialité, ton franc-parler et tes éclats de rires ont été essentiels à mon bonheur ! Je suis fière d'être ta petite choupette et tu me manques tous les jours depuis que tu as pris ta retraite !*

*Un grand merci à l'****équipe Yves Le Bouc/Irène Netchine*** *! Merci à* ***Erik*** *d'avoir partagé mes premiers moments dans ce laboratoire et d'avoir participé à mes premiers fous rires dans l'équipe grâce à son rire plus que communicatif ! Merci à* ***Patricia*** *d'avoir accepté de partager son bureau avec moi et d'avoir accompagné mes journées de sa joie de vivre et de sa bonne humeur ! Merci à l'équipe localisée à trousseau. Merci à* ***Laurence*** *pour son sourire quoi qu'il arrive, pour ses potins et pour nos nombreuses discussions. Merci à* ***Annick*** *pour m'avoir montrée mes toutes premières qPCR en M2 et pour son soutien. Merci à* ***Walid*** *le thésard le plus zen et le plus passionné par son sujet qu'il m'ait été donné de rencontrer, merci pour ta bonne humeur à toute épreuve et pour m'avoir expliquée maintes et maintes fois l'empreinte parentale ! Merci à* ***Frédéric*** *et* ***Héloïse*** *pour leur intérêt pour mon sujet, leurs nombreuses contributions lors de mes présentations et pour leur incroyable gentillesse (vive les pédiatres !) Merci à* ***Virginie*** *pour son sourire permanent et bien-sûr merci au* ***Pr. Irène Netchine*** *pour ses contributions lors des réunions d'équipe.*

*Merci à nos colocataires du 5ème étage l'**équipe du Pr. Francis Berenbaum**. Merci particulièrement à **Xavier** qui derrière l'enseignant est quelqu'un rempli de patience, de gentillesse, de joie et de folie, merci pour ton soutien, pour ta bonne humeur le midi et pour tes histoires de langoustes et de clubs nudistes ! Merci à **Claire** la maman de l'équipe, merci pour ta gentillesse et pour mettre en avant le meilleur de chaque personne. Merci à **Sandy** (à l'incroyable gentillesse et à nos nombreux bavardages !), **Marion**, **Alice**, **Cindy**, **Meriam**, **Audrey**, **Maria-Louisa, Sabine** pour tous les moments que nous avons passés ensemble et pour nos rires. Merci d'avoir donné vie à ce laboratoire!*

*Merci à l'**équipe du 6ème étage** dans son ensemble, merci à **Anastasia** (l'enfant au cœur en or du groupe), **Léa** (la grande méchante vraiment gentille !), **Pauline**, **Philippe**, **Viviane**, **Loic** et **Michel**. Mais un merci tout particulier à **Olivier** pour ta gentillesse inégalable, pour avoir écouté mes potins, mes plaintes et mes blagues avec un grand sourire, merci pour ton soutien qui a été essentiel pour ne pas que je sombre dans la folie ! Un grand merci à **Florence**, pour avoir fondé avec moi le club courage/fin de thèse, merci pour ta bonne humeur et ton rire incomparable, merci pour nos discussions, pour ton soutien et tes doutes qui ont accompagné les miens… merci d'avoir été mon amie tout simplement…*

*Merci à l'**équipe du 3ème étage** pour sa bonne humeur. Merci à K**ristell** et **Olivier** le duo inséparable, pour leurs confidences, leur gentillesse et leur soutien. Merci à **Malorie**, **Adem** et **Romane** pour leur bonne humeur, leurs nombreuses offrandes (chocolat, bonbons…) et leurs encouragements. Merci à **Stéphane**, l'acolyte de la laverie pour sa joie de vivre contagieuse, son enthousiasme et pour ne jamais laisser un verre vide (méfiez-vous le jour du pot !)*

*Merci au **personnel de l'animalerie** pour avoir pris tant soin de mes petites souris ! Merci d'avoir gardé espoir malgré la voracité et le cannibalisme particulier de mes C57 ! Merci à **Tatiana**, **Alizée et Timothé** pour vos sourires, votre dynamisme et pour s'être réjouis autant que moi à la vue de la survie d'une portée restreinte ! Merci à **Laetitia** pour tes confidences, ton soutien et tout le temps que tu m'as accordé à me former, à m'aider ou encore à discuter.*

*Un merci général au **personnel du centre de recherche** pour leur accueil et pour les nombreux pots organisés !*

*Merci à **ma belle-famille** pour leur réconfort, leur gaieté expansive, leur soutien et leur fierté avant même que je n'explique mon projet !*

*Merci à mes nombreux **amis** qui ont contribué à ce que je ne devienne pas folle au cours de ma thèse et pour nos nombreuses soirée ! Merci à **Hélène**, **Carole**, **Marie**, **Julie**, **Fatima**, **Vanessa**, **Ariane**, **Perrine**, **Laura**, **Figo**, **Eliott**, **Jo**, **Quentin**, **Max**, **Geoffrey**, **Kinder**, **Kevin, Asche…** Un merci tout particulier à mon **Ostralo** qui m'a toujours soutenue et encouragée quel que soit la date et l'heure. Merci d'avoir dansé avec moi, chanté avec moi, monté à cheval avec moi, crié avec moi, eu des fous rires avec moi et donc pour avoir pleinement contribué à mon bonheur ! Et puis peu importe où l'on va l'important est qu'on y aille ensemble…*

*Pour finir merci à **Aude** mon opossum, autrement dit Crash. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi depuis que l'on s'est rencontrées car on est pareille mais en différente. Je vais juste te remercier d'être toi tout simplement, ma confidente, ma sœur de cœur, mon pilier (de bar, mais surtout de soutien !). On s'est rencontrées, moi en manteau rose, toi en talon haut, qui aurait crû qu'on en arriverait là ! Je suis fière de ce qu'on a construit et de notre amitié inégalable. Tu es une des personnes les plus extraordinaires qui anime ma vie… merci pour tout ! Crash et Eddy c'est pour la vie !*

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS 4

LISTE DES ILLUSTRATIONS 8

LISTE DES TABLEAUX 11

AVANT-PROPOS 12

INTRODUCTION 14

I. La croissance et le système IGF (*insulin like growth factor*) 15

A. Ligands IGFs 15

1. IGF-1 16

2. IGF-2 17

B. Récepteurs 18

C. Les IGFBPs 20

D. Voies de signalisations 22

II. Le complexe hypothalamo-hypophysaire 24

A. Neuroanatomie 24

1. Hypothalamus 24

2. Eminence médiane 25

3. L'hypophyse 27

B. Fonctions hypothalamo-hypophysaires 28

1. Axes hypothalamo-hypophysaires 28

a. Neurones magnocellulaires et posthypophyse 29

b. Neurones parvocellulaires et antéhypophyse 29

α. L'axe somatotrope 30

Composition 30
Fonctions 34
β. L'axe thyréotrope 35
γ. L'axe gonadotrope 36
δ. L'axe corticotrope 37
ε. L'axe lactotrope 37
2. Fonctions neuro-neuronales de l'hypothalamus 37

III. Impact d'une dénutrition périnatale 41

A. Impact d'une dénutrition périnatale sur la croissance 41

B. Impact d'une dénutrition en période périnatale sur l'émergence des pathologies (DOHAD) 43

1. Pathologies cardio-métaboliques et syndrome métabolique 44
2. Pathologies Neurologiques 46

C. Effet de la nutrition périnatale sur l'hypothalamus 47

IV. Le développement neuronal 51

A. Neurogenèse 51

1. Prolifération, différenciation et migration neuronale 52
2. Développement de l'arborisation dendritique et croissance axonale 53

B. Rôle de l'IGF-1 dans la neurogenèse 55

C. Rôle de la leptine dans la neurogenèse 59

D. Rôle de l'insuline dans la neurogenèse 61

V. Objectifs de la thèse 63

RESULTATS 65

Etude de l'impact de l'alimentation postnatale précoce sur la mise en place de l'axe somatotrope 66

I. IGF-1 Induces GHRH Neuronal Axon Elongation in Response to Nutrition during Early Postnatal Life in Mice..... 66

Contexte : 67

Objectif : 67

Article : 69

Résultats & Discussion : 89

II. Impact de l'insuline et de la leptine sur la croissance axonale des neurones à GHRH. 94

Contexte : 95

Objectif : 96

Matériel & Méthodes : 96

Résultats : 98

Discussion : 102

Etude du retard de croissance intra utérin ou RCIU 105

Impact de la restriction nutritionnelle *in utero* sur la croissance et le métabolisme 105

Contexte : 106

Objectif : 106

Matériel & Méthodes : 107

Résultats : 108

Discussion : 112

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES 116

BIBLIOGRAPHIE 127

LISTE DES ABREVIATIONS

αMSH	*α melanocyte stimulating hormone*
AC	*adenylyl cyclase*
ACTH	*adrénocorticotrophine*
ADH	*hormone anti-diurétique*
AgRP	*agouti-related protein*
AKT	*thymoma viral proto-oncogene*
ALS	*acide labile subunit*
ARC	*noyau arqué*
AVPV	*noyau antéro-ventral périventriculaire*
BAD	*BCL2 associated agonist of cell death*
BCL2	*B cell lymphoma 2*
BDNF	*brain-derived neurotropic factor*
BrdU	*bromodeoxyuridine*
CART	*Cocaine and Amphetamine Related Transcript*
CLOCK	*circadian locomotor output cycles kaput*
CREB	cAMP response element binding
CRH	*corticotropin releasing hormone*
CRY	*cryptochrome*
CTCF	*CCCTC-binding factor*
DA	*dopamine*
DIO	*diet induce obesity*
DMH	*noyau dorsomédian*
DMRs	*differentially methylated region*
DOHaD	*Developmental origins of health and disease (Origine développementale de la santé et des pathologies adultes)*
DS	*déviation standard*
dw	*snell dwarf*
$E_{(x)}$	*x jours embryonnaires*

ERK1, 2	*Extracellular signal-regulated kinase 1, 2 (ou MAPK3, 1)*
FAS	*fatty acid synthase*
FSH	*hormone folliculostimulante*
GAL	*galanine*
GFAP	*glial fibrillary acidic protein*
GH	*hormone de croissance, growth hormone*
GHBP	*growth hormone binding protein*
GHR	*GH recepteur*
GHRH	*growth hormone releasing hormone*
GHRH-R	*GHRH récepteur*
GHS-R	*Growth hormone secretagogue receptor*
GnRH	*gonadotropin releasing hormone*
GON	*gonadotropic cells*
GRB2	*growth factor receptor bound protein 2*
GSK-3β	*glycogen synthase kinase 3β*
HTA	*hypertension artérielle*
ICR	*imprinting control region*
IGF-1	*insulin like growth factor 1*
IGF-1R	*Récepteur de type 1 aux IGFs*
IGF-2	*insulin like growth factor 2*
IGF-2R	*Récepteur de type 2 aux IGFs*
IGFBP	*insulin like growth factor binding protein*
IMC	*indice de masse corporelle*
IRS	*insulin receptor substrate*
JAK	*Janus Kinases*
Kiss1	*kisspeptine*
LCR	*liquide céphalorachidien*
LH	*hormone lutéinisante*
LHA	*aire latérale hypohalamique*
lit	*little (dwarf)*
LPS	*Lipopolysaccharide*

MAPK	*mitogen activated protein kinases*
ME	*éminence médiane*
MEK	*MAPK/ERK kinase (ou MAP2K)*
MMP	*matrix metalloproteinase*
mTORC	*mammalian target of rapamycin complex*
NGF	*nerve growth factor*
NPY	*Neuropeptide Y*
NT	*neurotrophin*
OT	*ocytocine*
P(x)	*x jours postnatals*
PAR	*réponse prédictive adaptative*
PDK1	*phophoinositide dependant protein kinase 1*
PeV	*noyau périventriculaire*
PEPCK	*phospho enol pyruvate carboxy kinase*
PER	*period*
PI3K	*phosphatidyl inositol 3' kinase*
PIP2	*phosphatidyl inositol diphosphate*
PIP3	*phosphatidyl inositol triphosphate*
PIT-1 (POU1F1)	*pituitary specific positive transcription factor 1*
POA	*aire préoptique antérieure*
POMC	*proopiomélanocortine*
PPP	*picropodophyllotoxine*
PRL	*prolactine*
PVN	*noyau paraventriculaire*
RAF	*rapidly accelerated fibrosarcoma (ou MAP3K)*
RAS	*rat sarcoma*
RCIU	*retard de croissance intra utérin*
S6K	*S6 kinase*
SCh	*noyaux suprachiasmatiques*
SGA	*small for gestational age*
SGZ	*zone sous granulaire*
Shc	*SRC homology 2 domain containing transforming protein*

SHH	*Sonic Hedgehog*
SNC	*système nerveux central*
SNP	*système nerveux périphérique*
SOCS6	*suppressor of cytokine signaling 6*
SON	*noyau supraoptique*
SOS	*son of sevenless*
SRIH	*somatostatine*
SRIH-R/SST$_{(x)}$	*somatostatin receptor*
STAT	*Signal Transducers and Activators of Transcription*
SVZ	*zone sous ventriculaire*
$\mathcal{T}$3	*triiodothyroxine*
T4	*thyroxine*
TA	*tissu adipeux*
TH	*hormone thyroïdienne*
TN	*neurotensine*
TRH	*Thyrotropin releasing hormone*
TSH	*thyréostimuline*
TuJ1	*neuron-specific β tubulin*
$\mathcal{U}$CP	*uncoupling protein*
$\mathcal{V}$MH	*noyau ventromédian*
$\mathcal{Y}$(x)r	*Neuropeptide (x) Y receptor*

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Effet de différentes invalidations génétiques du système IGF sur la croissance fœtale chez la souris.

Figure 2 : Structure du gène *Igf-1* chez les rongeurs.

Figure 3 : Structure du domaine *Igf-2/H19* de la souris.

Figure 4 : L'*Igf-2*, un gène soumis à empreinte parentale.

Figure 5 : Affinité des IGFs et de l'insuline à leurs récepteurs.

Figure 6 : Représentation des IGFBPs et IGFs dans la circulation.

Figure 7 : Représentation schématique des voies de signalisations activées par le système IGF.

Figure 8 : Organisation tridimensionnelle des noyaux majeurs de l'hypothalamus.

Figure 9 : Représentation schématique du développement embryonnaire du cerveau.

Figure 10 : Coloration au crésyl violet d'une coupe coronale de cerveau murin.

Figure 11 : Coupe coronale d'un hypothalamus de rat au niveau de l'éminence médiane.

Figure 12 : Illustration du pôle basal des tanycytes β au niveau de l'éminence médiane.

Figure 13 : Représentation du complexe hypothalamo-hypophysaire.

Figure 14 : Représentation en pourcentage des différents types cellulaires de l'antéhypophyse chez les souris mâles et femelles.

Figure 15 : Représentation du complexe hypothalamo-hypophysaires et de leurs organes cibles.

Figure 16 : Représentation de l'axe somatotrope.

Figure 17 : Action régulatrice du GHRH et du SRIH sur la sécrétion de GH par les cellules somatotropes.

Figure 18 : Représentation des voies de signalisations activées par la GH.

Figure 19 : Représentation de la pulsatilité de l'hormone de croissance (GH) chez le rongeur.

Figure 20 : Contrôle de l'homéostasie énergétique *via* les neurones à NPY/AgRP et les neurones à POMC/CART.

Figure 21 : Représentation des poids fœtaux (g) et des percentiles pour l'âge gestationnel chez l'Homme.

Figure 22 : Rôle de l'IGF-1 dans la programmation de l'axe somatotrope.

Figure 23 : Représentation schématique d'un neurone.

Figure 24 : Illustration d'une partie des grandes étapes du développement neuronal.

Figure 25 : Représentation schématique de la croissance axonale.

Figure 26 : Représentation schématique du rôle de l'IGF-1 au cours de la neurogenèse postnatale.

Figure 27 : Représentation de l'action neuro-développementale de la leptine sur le cerveau.

Figure 28 : Immunomarquage des neurones à GHRH de cerveaux de souriceaux GHRH-eGFP âgés de 7 jours normalement nourris selon différents plans de coupes.

Figure 29 : Rôle de l'IGF-1 sur le nombre d'axones quantifiés par explant.

Figure 30 : Réponse des neurones à GHRH issus de souris normalement nourries à des doses croissantes d'IGF-1.

Figure 31 : Implication de l'insuline présente dans le B27 sur le nombre d'axones quantifiés par explant.

Figure 32 : Réponse des neurones à GHRH issus de souris restreintes à des doses croissante d'IGF-1.

Figure 33 : Réponse des neurones à GHRH à l'inhibition des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK.

Figure 34 : Expression des différents facteurs des voies de signalisation de l'IGF-1 chez des souriceaux normalement nourris ou restreints en période de lactation.

Figure 35 : Rôle de l'insuline sur le nombre d'axones quantifiés par explant.

Figure 36 : Rôle de l'insuline sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué.

Figure 37 : Croissance axonale des neurones à AgRP traités à l'insuline chez les souris normalement nourries.

Figure 38 : Croissance axonale des neurones du noyau arqué issus de souris restreintes en période de lactation en présence de doses croissantes d'insuline.

Figure 39 : Croissance axonale des neurones à AgRP traités à l'insuline chez des souriceaux restreints.

Figure 40 : Expression hypothalamique du récepteur à l'insuline à P10.

Figure 41 : Concentration plasmatique en leptine.

Figure 42 : Localisation du récepteur à la leptine sur les cultures d'explants de noyau arqué.

Figure 43 : Impact de la leptine sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué chez des souris normalement nourries.

Figure 44 : Analyse de l'impact de la leptine sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué dans les explants issus de souris restreintes.

Figure 45 : Expression hypothalamique du récepteur à la leptine à 10 jours de vie.

Figure 46 : Présentation du modèle murin d'induction de RCIU.

Figure 47 : Impact de la restriction alimentaire des femelles gestantes sur la croissance fœtale.

Figure 48 : Courbes de croissances postnatales en fonction de la nutrition périnatale.

Figure 49 : Effet du RCIU sur la taille et l'index de Lee chez la souris.

Figure 50 : Données anthropométriques des souris adultes nées avec un RCIU.

Figure 51 : Estimation de la densité glomérulaire des souris adultes nées avec un RCIU.

Figure 52 : Poids du tissu adipeux des souris adultes nées avec un RCIU.

Figure 53 : Poids corporel des souriceaux de fond génétique C57 Bl/6J ou C57Bl/6J x129/SvPas.

Figure 54 : Fréquence de l'ouverture vaginale des femelles RCIU.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Phénotypes des modèles de souris transgéniques sur-exprimant les IGFBPs.

Tableau 2 : Compositions nutritives des aliments utilisés pour le protocole de RCIU.

AVANT-PROPOS

La croissance est un processus dynamique et complexe contrôlé par des facteurs génétiques et environnementaux, de manière directe et/ou indirecte par l'intermédiaire, entre autres, des facteurs de croissance. Elle a lieu au cours du développement fœtal et postnatal, et se traduit par une importante prolifération cellulaire, un accroissement de la taille du corps et de l'ensemble des organes. La période de croissance est aussi associée à une maturation structurale et fonctionnelle. Ainsi, un apport nutritionnel correct est indispensable pour soutenir une qualité et une vitesse de croissance adaptées. La période où la vitesse de croissance est la plus importante se situe en période périnatale, qui inclut le développement en période fœtale et postnatale précoce. La croissance au cours de cette période fait majoritairement intervenir le système *Insulin Like Growth Factor* (IGF) indépendamment de l'hormone de croissance (GH, *growth hormone*). La croissance postnatale fait quant à elle intervenir l'axe somatotrope qui inclut notamment la GH et l'IGF-1.

Notre équipe a précédemment montré que la nutrition au cours de la période postnatale précoce programme l'activité de l'axe somatotrope. Une altération de la nutrition au cours de cette période est associée à une modification de la croissance staturo-pondérale et à une susceptibilité accrue de développer des pathologies de type cardio-métabolique à l'âge adulte. Ces données sont en cohérence avec l'hypothèse des origines développementales de la santé et des pathologies adultes (*Developmental Origins of Health and Disease*, DOHaD), qui implique un mécanisme « d'adaptation prédictive » à l'environnement futur (Barker, D. J., 2007). Dans le modèle murin que nous avons développé, l'augmentation à la naissance de la taille des portées de 6 à 10 petits par mère induit une restriction alimentaire chez les souriceaux de P1 à P16 (période de la lactation). Cette restriction engendre une baisse des taux circulants des hormones dépendantes de la nutrition comme l'IGF-1 (*insulin like growth factor* 1), la leptine et l'insuline.

Nous avons pu montrer que la restriction nutritionnelle durant la lactation induisait une altération définitive de la mise en place de l'axe somatotrope au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire : la diminution du stimulateur GHRH (*growth hormone releasing*

hormone) synthétisé par le noyau arqué de l'hypothalamus induit une diminution du contenu hypophysaire en hormone de croissance (GH) (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Si le rôle du GHRH sur la prolifération des progéniteurs hypophysaires des cellules synthétisant la GH est bien connu, les mécanismes sous-jacents permettant de faire le lien avec la restriction alimentaire ne sont pas encore bien compris. De manière intéressante, les conséquences de la restriction sur la croissance et la mise en place de l'axe somatotrope peuvent être mîmées par une invalidation partielle du récepteur de l'IGF-1 ($IGF1R^{+/-}$) dans le cerveau (Kappeler, L. *et al.*, 2008). Ces données confortent ainsi un rôle important des taux circulants d'IGF-I en période périnatale pour le développement de l'axe somatotrope. La leptine et l'insuline ont quant à elles été impliquées dans l'innervation des neurones régulant la prise alimentaire et localisés comme les neurones à GHRH dans le noyau arqué (Bouret, S. G. *et al.*, 2004; Vogt, M. C. *et al.*, 2014).

Au cours de ma thèse, je me suis attachée à comprendre comment la restriction alimentaire altérait la programmation de l'axe somatotrope et notamment l'innervation de l'éminence médiane par les neurones à GHRH au cours de la premiere semaine de vie. J'ai centré mon étude sur le rôle de 3 hormones nutritionnelles : l'IGF-1, la leptine et l'insuline. J'ai également voulu vérifier la fenêtre de susceptibilité de la programmation de l'axe somatotrope en période fœtale.

Aussi, le travail présenté dans cette thèse s'articulera en 3 parties : A) une partie introductive présentant les données de la littérature i) sur la régulation de la croissance périnatale par le système IGF- celle-ci étant indépendante de l'hormone de croissance durant cette période -, puis ii) sur l'anatomie du complexe hypothalamo-hypophysaire et notamment sur l'axe somatotrope qui est impliqué dans la croissance postnatale, et iii) l'impact d'une dénutrition sur la croissance et les pathologies adultes (DOHAD). Enfin, ce travail se focalisant sur le développement des neurones à GHRH, iv) une description des implications connues de l'IGF-1, de la leptine et de l'insuline sur le neurodéveloppement est aussi présentée. Cette partie introductive sera suivie B) d'une partie présentant et discutant les résultats expérimentaux obtenus, et C) d'une dernière partie présentant les conclusions et les perspectives de ces travaux.

INTRODUCTION

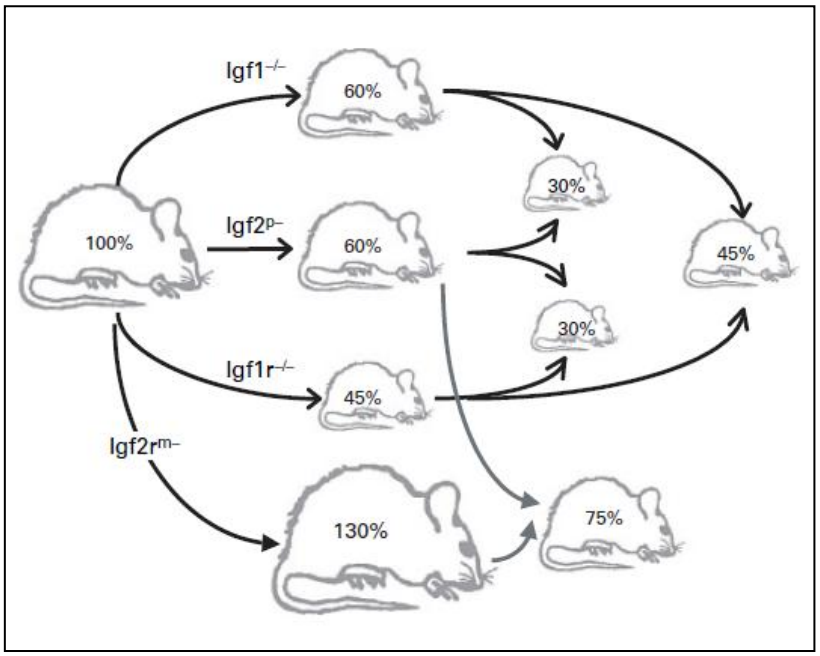

Figure 1 : Effet de différentes invalidations génétiques du système IGF sur la croissance fœtale chez la souris. Expression en pourcentage de la croissance pondérale par rapport au poids normal. m-= inactivation allèle maternel, p-= inactivation allèle paternel, -/- inactivation des deux allèles. D'après Gicquel, C *et al.* (Gicquel, C. *et al.*, 2006).

I. La croissance et le système IGF (*insulin like growth factor*)

Durant la période *in utero* et postnatale précoce, une grande partie de la croissance est régulée par les IGFs de type 1 et 2 (IGF-1 et IGF-2) (Powell-Braxton, L. *et al.*, 1993; Allan, G. J. *et al.*, 2001; Gicquel, C. *et al.*, 2006), indépendamment de l'hormone de croissance jusqu'à environ 2 semaines de vie chez la souris. Une altération du système IGF chez des souris transgéniques induit des altérations de la croissance *in utero* **(Figure 1)**. Ainsi une inactivation de l'*Igf-1* ou de l'*Igf-2* induit une diminution de 40% du poids de naissance. L'inactivation des récepteurs aux IGFs engendre également des altérations de la croissance. En revanche, l'absence de GH chez les animaux transgéniques n'altère pas la croissance anténatale, ce qui est en accord avec un effet indépendant des IGFs au cours de la vie fœtale (Baker, J. *et al.*, 1993). Cette phase est la période la plus importante de la croissance, elle peut atteindre jusqu'à 2.5cm/semaine à son maximum au cours du 2ème trimestre de gestation chez l'Homme (Rosenbloom, A. L., 2007).

A. Ligands IGFs

Au cours de la vie fœtale, la croissance est principalement contrôlée par les IGFs (*insulin like growth factor*) autrefois appelés somatomédines (Powell-Braxton, L. *et al.*, 1993). On distingue deux ligands IGFs, l'IGF de type 1 et l'IGF de type 2. Ces deux facteurs sont sécrétés de façon ubiquitaire et sont retrouvés notamment au niveau de l'os, du cartilage et du muscle. Ils ont une action autocrine et paracrine notamment sur la prolifération, la survie cellulaire et la différenciation. De par leurs sécrétions ubiquitaires, on les détecte aussi dans le sang, suggérant ainsi en parallèle une action endocrine (Gicquel, C. *et al.*, 2006).

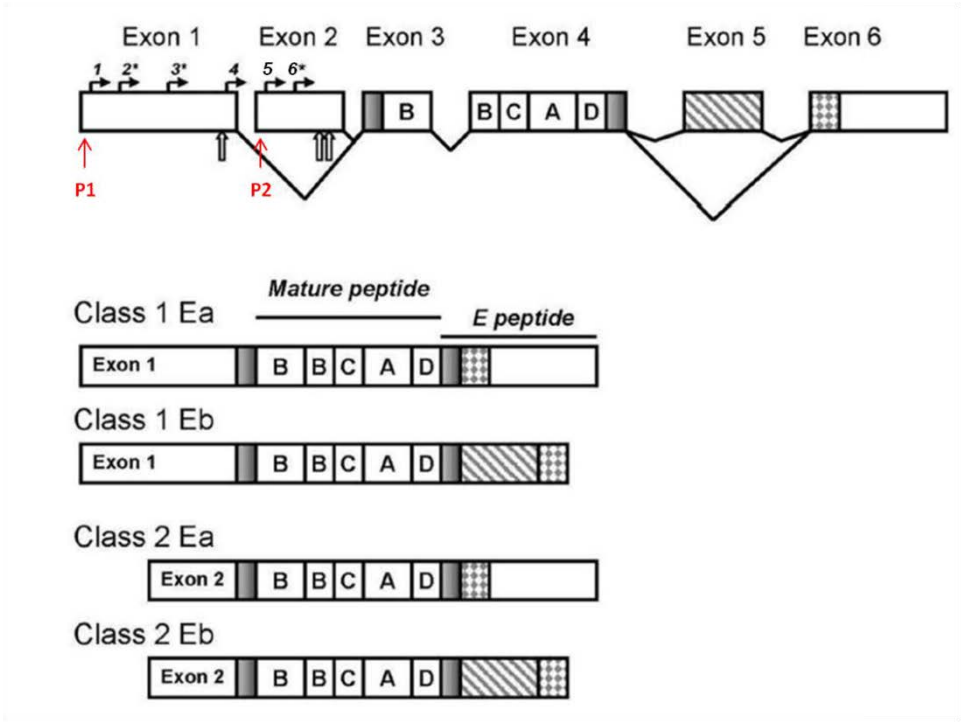

Figure 2 : Structure du gène *Igf-1* chez les rongeurs. Le gène *Igf-1* est constitué de 6 exons et de 6 sites d'initiations de la transcription illustrés par les flèches noires et de deux promoteurs notifiés P1 et P2. Les sites majoritairement utilisés sont marqués par les astérisques. Les sites d'initiations de la traduction sont illustrés par les flèches blanches. L'épissage des exons génère plusieurs transcrits qui varient dans leurs parties 5' et 3' tandis que le peptide mature est identique. Ce peptide est constitué de 4 domaines B, C, A et D. Adapté de Oberbauer, A. M. (Oberbauer, A. M., 2013).

1. IGF-1

L'*Igf-1* est un gène constitué de 6 exons localisé sur le chromosome 10 chez la souris (chromosome 12 chez l'homme). L'IGF-1 est extrêmement important pour le développement de l'organisme, et sa séquence a été hautement conservée au cours de l'évolution. L'*Igf-1* est constitué de plusieurs sites d'initiation et de deux promoteurs, P1 au niveau de l'exon 1 et P2 au niveau de l'exon 2 (Temmerman, L. *et al.*, 2010). Il est généralement accepté que le promoteur P1 est utilisé de manière ubiquitaire tandis que le promoteur P2 est principalement régulé de manière GH dépendante. Ces deux promoteurs sont importants pour le développement de l'organisme. L'expression de ces promoteurs est fortement associée à des régulations épigénétiques ce qui permet de réguler la transcription d'*Igf-1* (Chia, D. J. *et al.*, 2010; Tosh, D. N. *et al.*, 2010; Oberbauer, A. M., 2013). Néanmoins, l'expression de ce gène produit un seul peptide mature **(Figure 2)** (Oberbauer, A. M., 2013).

L'*Igf-1* produit un peptide monocaténaire de 70 acides aminés (7.5kDa). La forme mature de l'IGF-1 ou somatomédine C contient 4 domaines : B-C-A-D. Le domaine B est impliqué dans la liaison de l'IGF-1 à son récepteur ou encore à ses protéines de liaisons. L'IGF-1 est un facteur de prolifération, de différenciation et de survie cellulaire. Il possède également un rôle hypoglycémiant et stimule l'anabolisme protéique. Afin d'étudier le rôle de l'IGF-1, plusieurs modèles d'invalidation génétique ont été générés et reflètent son rôle crucial notamment pour la croissance. Ainsi, l'inactivation complète d'IGF-1 (*Igf-1*$^{-/-}$) induit une diminution de 40% du poids à la naissance et affecte la viabilité des souriceaux avec 95% de morts à la naissance **(Figure 1)** (Powell-Braxton, L. *et al.*, 1993). En effet, l'IGF-1 active la production de surfactant par les cellules pulmonaires et son invalidation entraine une détresse respiratoire souvent létale dans les premières minutes de vie. Les souris *Igf-1*$^{-/-}$ survivantes présentent une aggravation de la croissance postnatale, une atrophie musculaire, un défaut de développement osseux, ainsi qu'une infertilité (Powell-Braxton, L. *et al.*, 1993). Au cours de la période *in utero* et postnatale précoce, l'IGF-1 est fortement régulé par la nutrition, dépendant entre autres de l'apport protéique surtout chez l'homme (Olivier, P. *et al.*, 2007; Fontana, L. *et al.*, 2008). De manière importante, si l'IGF-2 a été détecté comme facteur sérique majoritaire associé à la croissance fœtale, il n'est pas impliqué dans la croissance postnatale et n'est pas influencé par le statut nutritionnel, seul l'IGF-1 circulant contrôle la croissance postnatale (Powell-Braxton, L. *et al.*, 1993). Ainsi, une baisse de

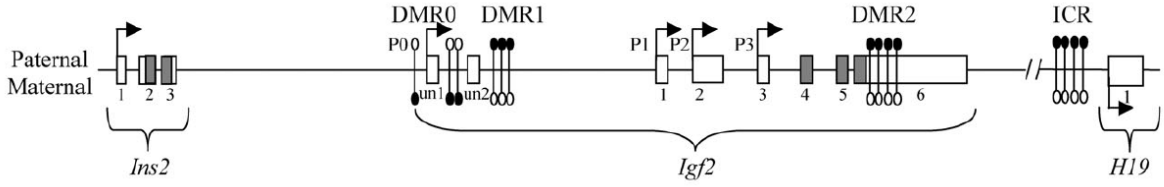

Figure 3 : Structure du domaine *Igf-2/H19* de la souris. Le gène *Igf-2* contient quatre promoteurs P0, P1, P2 et P3. On distingue plusieurs régions de méthylation : les DMRs (*differentially methylated region*) et l'ICR (*imprinting control region*) qui régulent l'expression de l'*Igf-2*. Les différents sites de méthylation sont représentés avec les cercles noirs pour les domaines méthylés et les cercles blancs pour les domaines non méthylés, selon l'origine maternelle ou paternelle du chromosome. D'après Monk, D. *et al.* (Monk, D. *et al.*, 2006).

l'apport alimentaire en période fœtale ou postnatale précoce est associée à une diminution de l'expression d'IGF-1 et conduit à un retard de croissance (Holt, R. I., 2002; Kappeler, L. *et al.*, 2009; Ikeda, N. *et al.*, 2015).

2. IGF-2

L'IGF-2, le second membre de la famille des IGFs, est produit à partir du gène *Igf-2* constitué de 6 exons et localisé sur le chromosome 7 chez la souris (chromosome 11 chez l'homme) **(Figure 3)**. L'*Igf-2* est encadré en 5' par le gène de l'insuline (*Ins2*) et en 3' par le gène du long ARN non-codant *H19*. L'*Igf-2* possède quatre promoteurs, P0 localisé en amont de l'exon 1 et P1, P2, P3 localisés respectivement sur les exons 1, 2 et 3. Les différents promoteurs produisent différents transcrits qui forment tous la même protéine mature constituée de 67 acides aminés d'un poids moléculaire de 7.4kDa. Le promoteur P0 est uniquement exprimé au niveau placentaire tandis que les promoteurs P1 à P3 sont exprimés de manière globale dans l'embryon et le placenta (Constancia, M. *et al.*, 2002; Monk, D. *et al.*, 2006).

Chez la souris, il a été observé que l'inactivation de l'*Igf-2* conduit à une diminution de 40% du poids de naissance, mais ne perturbe pas la viabilité des nouveau-nés à la naissance **(Figure 1)** (DeChiara, T. M. *et al.*, 1990; Gicquel, C. *et al.*, 2006). De plus, une inactivation spécifique du promoteur P0 de l'*Igf-2* induit une diminution du développement placentaire, ce qui engendre une diminution visible de la croissance fœtale à $E_{19.5}$ suite à une insuffisance des échanges fœtaux-maternels (Constancia, M. *et al.*, 2002). De manière importante, si l'IGF-2 a été détecté comme facteur sérique majoritaire *in utero*, son expression diminue rapidement après la naissance dans le modèle murin, mais son expression reste importante chez l'Homme.

L'*igf-2* est un gène soumis à empreinte parentale. L'empreinte parentale désigne l'expression d'un gène par un seul des allèles en fonction de l'origine de ce dernier, maternel ou paternel. L'*Igf-2* est majoritairement exprimé par l'allèle paternel (Gicquel, C. *et al.*, 2006). On distingue plusieurs régions de méthylation différentielle, les DMRs

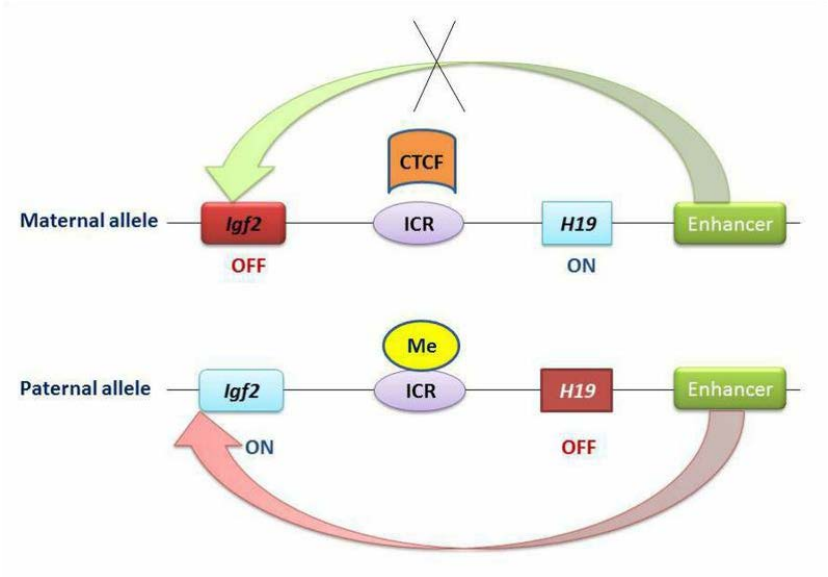

Figure 4 : L'*Igf-2*, un gène soumis à empreinte parentale. *H19* et l'*Igf-2* sont exprimés par un seul chromosome parental : l'*Igf-2* est uniquement exprimé par l'allèle paternel tandis que *H19* est exprimé par l'allèle maternel. Le locus *Igf-2* présente une région *enhancer* et une région ICR (*imprinting coding region*). L'ICR1 paternel est méthylé, ce qui empêche la liaison de la protéine insulatrice CTCF à l'ICR1 et ainsi l'interaction entre le domaine *enhancer* et les promoteurs d'I*gf-2* paternel et donc sa transcription. Sur l'allèle d'origine maternelle, la protéine CTCF se lie au domaine ICR non méthylé ce qui ne permet pas l'interaction entre les *enhancers* et l'*Igf-2*. Dans cet allèle, seul l'*H19* est transcrit. D'après Hajjari, M. *et al.* (Hajjari, M. *et al.*, 2014).

(*differentially.methylated region*), et les ICR (*imprinting control region*), qui permettent de réguler l'expression de l'*Igf-2*, notamment par l'ICR1. L'absence de méthylation au niveau du centre d'empreinte maternel ICR1 favorise la fixation de la protéine insulatrice, le CTCF (*CCCTC-binding factor*), qui empêche l'interaction entre les sites *enhancers* situé en aval d'*H19* avec les promoteurs d'*Igf-2* et ainsi sa transcription **(Figure 4)**. En revanche, la présence d'une méthylation sur le centre d'empreinte ICR1 paternel empêche la fixation de CTCF et permet ainsi l'interaction des *enhancers* avec les promoteurs d'*Igf-2* et donc sa transcription (Hajjari, M. *et al.*, 2014).

Une altération de l'empreinte parentale a notamment été associée à des pathologies syndromiques de la croissance : le syndrome de Beckwith-Wiedemann caractérisé entre autres par une croissance excessive *in utero* et le syndrome de Silver-Russel caractérisé par un retard de croissance intra-utérin (Gicquel, C. *et al.*, 2006; Monk, D. *et al.*, 2006; Demars, J. *et al.*, 2012).

B. Récepteurs

L'IGF-1 présente 2/3 d'acides aminés en commun avec l'IGF-2. De plus, comme le suggère leur nom, ils possèdent une structure proche de celle de l'insuline (50% d'homologie). Ainsi, de par leur structure proche, les IGFs font intervenir trois récepteurs potentiels : majoritairement le récepteur de type 1 aux IGFs (IGF-1R) et le récepteur de type 2 (IGF-2R), et dans une moindre mesure le récepteur de l'insuline (IR) (Collett-Solberg, P. F. *et al.*, 2000).

L'*Igf-1r* (*insulin like growth factor 1 receptor)* est constitué de 23 exons et est localisé sur le chromosome 7 chez la souris (chromosome 15 chez l'homme). L'*Igf-1r* code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase qui active les voies de signalisation PI3K/AKT (*phosphatidyl inositol 3' kinase / AGC kinase*) et MAP-Kinase (MAPK, *mitogen activated protein kinases*). L'IGF-1R est constitué de deux sous-unités α extracellulaires contenant les sites de liaisons des ligands, et de deux sous-unités β contenant un domaine transmembranaire et un domaine intra-cytoplasmique permettant la transduction de signaux. L'IGF-1R est indispensable à la croissance et au développement, ainsi son inactivation chez la

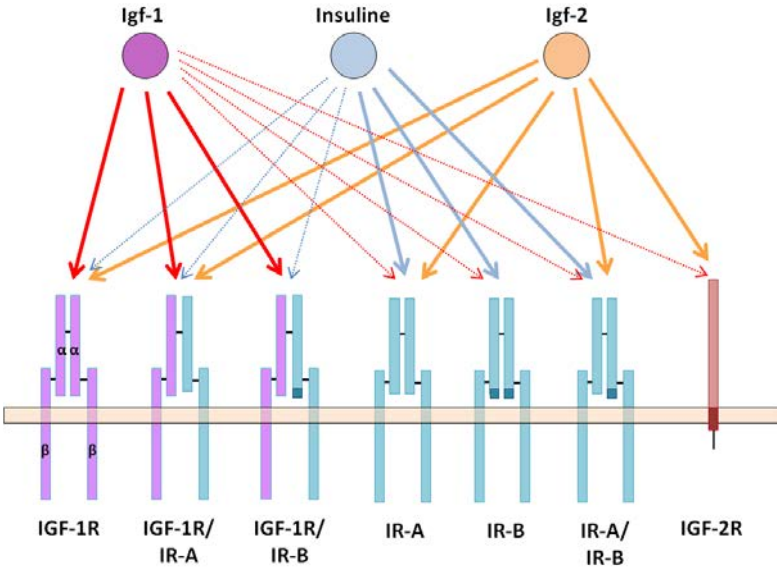

Figure 5 : Affinité des IGFs et de l'insuline à leurs récepteurs. On distingue l'IGF-1R, l'IGF-2R et le récepteur à l'insuline (IR). L'IR est présent en deux isoformes IR-A et IR-B. Il existe des récepteurs hybrides IGF-1R/IR. Les flèches pleines représentent une forte affinité et les flèches en pointillés les plus faibles affinités. Adapté de Sciacca L. *et al.* (Sciacca, L. *et al.*, 2012)

souris engendre un déficit statural de 55% à la naissance, avec une mortalité périnatale de 100% **(Figure 1)** (Baker, J. *et al.*, 1993).

L'*Igf-2r* (*insulin like growth factor 2 receptor*) est également soumis à empreinte parentale, et est quant à lui exprimé par l'allèle maternel. L'*Igf-2r* est situé sur le chromosome 17 de la souris (chromosome 6 chez l'homme). L'IGF-2R est un récepteur mannose-6-phosphate, liant principalement l'IGF-2, et présentant une faible affinité pour l'IGF-1. Ce récepteur permet de réguler la concentration d'IGF-2 en induisant son endocytose et sa dégradation par les lysosomes (Gicquel, C. *et al.*, 2006). Ainsi, la mutation de l'IGF-2R sur l'allèle maternel induit une augmentation de la biodisponibilité pour IGF-1R et donc de la croissance fœtale, avec un poids de naissance de 130 à 140% par rapport à la normale **(Figure 1)**. Cependant, ce gain de poids rend la mise-bas difficile et provoque une mortalité importante (Baker, J. *et al.*, 1993).

Les IGFs peuvent se lier avec leurs récepteurs avec une affinité variable **(Figure 5)** (Sciacca, L. *et al.*, 2012). Ainsi, l'IGF-1 se lie avec une forte affinité pour l'IGF-1R, et peut se lier dans une moindre mesure à l'IGF-2R et au récepteur de l'insuline (IR). Comme dit précédemment, le système insulinique et les IGFs dérivent d'un orthologue commun, et présentent encore une forte homologie. Aussi, l'IGF-1 peut donc se lier mais très modérément au récepteur à l'insuline. Ce dernier est également un récepteur à activité tyrosine kinase. On distingue 2 isoformes, résultant d'un épissage alternatif (IR-A et IR-B). On considère que les isoformes IR-A et IR-B ont respectivement un rôle prolifératif et métabolique (Frasca, F. *et al.*, 1999). Il existe également des récepteurs hybrides composés d'une sous-unité α et β du récepteur IGF-1R et d'une sous-unité α et β du récepteur à l'insuline : IGF-1R/IR. L'IGF-1 présente également une forte affinité pour les récepteurs hybrides.

L'IGF-2 se fixe quant à lui avec une forte affinité pour l'IGF-1R, l'IGF-2R et l'IR-A, ainsi que pour les hybrides IGF-1R/IR-A et IR-A/IR-B. L'isoforme IR-A est la forme prédominante au cours de la vie fœtale et permettrait ainsi d'assurer l'action de l'IGF-2 sur la croissance fœtale (Louvi, A. *et al.*, 1997; Pandini, G. *et al.*, 2002).

Enfin, l'insuline se fixe avec une forte affinité aux deux isoformes de son récepteur IR-A et IR-B ainsi qu'à son hybride IR-A/IR-B. L'insuline présente également une faible affinité pour l'IGF-1R (Sciacca, L. *et al.*, 2012).

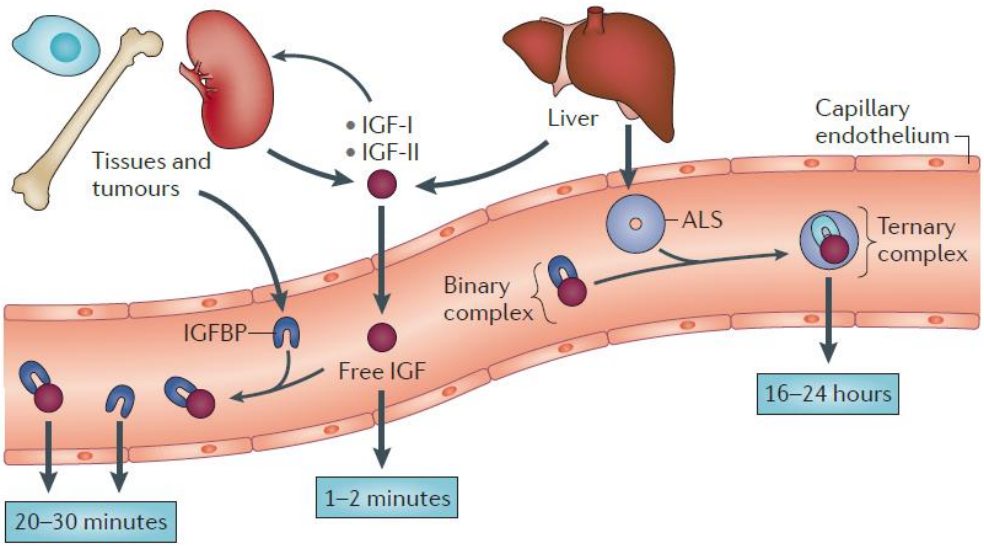

Figure 6 : Représentation des IGFBPs et IGFs dans la circulation. Les IGFs sont sécrétés de manière ubiquitaire. Ils ont une action autocrine, paracrine et également endocrine. Dans le sang et le milieu extra cellulaire, les IGFs peuvent former des complexes binaires avec les IGFBPs. Les complexes binaires avec l'IGFBP-3 ou l'IGFBP-5 peuvent interagir avec l'ALS (*acid labile subunit*) dans le sang, afin de former un complexe ternaire. Les demi-vies des IGFs sous forme libre ou sous forme de complexe sont indiquées sur le schéma. Les complexes ternaires ne peuvent pas passer la barrière des capillaires et nécessitent d'être dissociés. D'après Baxter, R. C. (Baxter, R. C., 2014).

C. Les IGFBPs

La bio-disponibilité des IGFs est régulée en grande partie par leurs protéines de liaison, les *Insulin like Growth Factor Binding Protein* (IGFBP). On distingue six protéines de liaisons, de l'IGFBP-1 à IGFBP-6 (Baxter, R. C. *et al.*, 1998). Les IGFBPs ont des poids moléculaires variant entre 23 et 31kDa avant modifications post-traductionnelles. Elles sont constituées de deux domaines conservés reliés par un domaine de liaison, variable entres les IGFBPs, et qui peut être clivée par des protéases et permettre ainsi la libération des IGFs (Dubaquie, Y. *et al.*, 2001). Les IGFBPs sont synthétisées à partir de gènes différents qui possèdent leurs régulations propres. Elles sont sécrétées par de nombreux tissus de façon spécifique et sont finement régulées notamment au cours du développement. Parmi elles, l'IGFBP-3 est prépondérante en période postnatale et est synthétisée au niveau hépatique sous le contrôle de la GH (*growth hormone*). Les IGFBPs lient les IGFs avec une affinité différente et permettent de moduler leurs actions en contrôlant leur demi-vie, leur transport et leur libération (Allan, G. J. *et al.*, 2001; Baxter, R. C., 2014). On distingue également l'ALS (*acide labile subunit*) de 85kDa produite par le foie, qui peut former un complexe ternaire de 150kDa avec l'IGFBP-3 ou l'IGFBP-5 liées avec l'IGF-1 ou l'IGF-2 et ainsi augmenter la demi-vie de ces derniers à plusieurs heures (Dubaquie, Y. *et al.*, 2001; Baxter, R. C., 2014). Quatre-vingt-dix pourcents de l'IGF-1 circulant est associé au complexe ternaire IGF-1/IGFBP-3/ALS. Une faible quantité est associée aux autres IGFBPs et seulement environ 1% est sous forme libre et donc biologiquement actif. La demi-vie de l'IGF-1 sous forme libre est seulement de 1 à 2 minutes, sa fixation à ses protéines de liaison augmente sa demi-vie de 20-30 minutes à 16 - 24 heures avec l'ALS. Ainsi, ces protéines de liaison sont indispensables à la régulation de l'IGF-1 **(Figure 6)** (Dubaquie, Y. *et al.*, 2001; Baxter, R. C., 2014).

Enfin, la présence d'IGFBPs protéases au niveau plasmatique est un élément clef pour la séparation des complexes IGF-IGFBPs. On distingue trois sortes de protéases agissant sur les complexes : les kallikréines, les cathepsines et les MMPs (*matrix metalloproteinase*). Elles sont notamment connues pour être augmentées au cours de la gestation augmentant ainsi la biodisponibilité des IGFs et favorisant donc la croissance placentaire et fœtale, et augmentent l'anabolisme chez la mère (Collett-Solberg, P. F. *et al.*, 2000; Rosenbloom, A. L., 2007).

Construction du transgène	Expression du transgène	Phénotype	Référence
IGFBP-1			
PGK-IGFBP-1	Ubiquitaire	RCIU, retard de croissance postnatal, altération de la fertilité, intolérance au glucose	Rajkumar, K. *et al.*, 1995, Endocrinology
hIGFBP-1	Foie	retard de croissance postnatal, altération de la fertilité, intolérance au glucose	Dubaquié, Y. *et al.*, 2000, Endocrinology Gay, E. *et al.*, 1997, Endocrinology
IGFBP-2			
CMV-IGFBP-2	Ubiquitaire	retard de croissance postnatal, diminution du poids des organes et du squelette	Hoeflich, A. *et al.*, 1999, Endocrinology
IGFBP-3			
PGK-IGFBP-3	Ubiquitaire	RCIU, retard de croissance postnatal, altération de la fertilité, intolérance au glucose	Modric, T. *et al.*, 2001, Endocrinology
CMV-IGFBP-3	Ubiquitaire	RCIU, retard de croissance postnatal, altération de la fertilité, intolérance au glucose	Modric, T. *et al.*, 2001, Endocrinology
IGFBP-4			
OC-IGFBP-4	ostéoblaste	RCIU, retard de croissance postnatal, diminution poids des os	Zhang, M. *et al.*, 2003, Journal of Bone and Mineral Research
IGFBP-5			
CMV-IGFBP-5	Ubiquitaire	RCIU, retard de croissance postnatal, altération de la fertilité, altération du développement musculaire	Salih, M. A. M. *et al.*, 2004, PNAS
IGFBP-6			
GFAP-IGFBP-6	système nerveux central	RCIU, retard de croissance, altération de la fertilité, altération du développement du cervelet	Bienvenu, G. *et al.*, 2004, Endocrinology
ALS			
ALS-/-	Ubiquitaire	Retard de croissance postnatal	Ueki, I. *et al.* , 2000, PNAS

Tableau 1 : Phénotypes des modèles de souris transgéniques sur-exprimant les IGFBPs. Les souris sur-exprimant une protéine de liaison, IGFBP ou ALS présentent en général un retard de croissance associé ou non à une intolérance au glucose et à des altérations de la fertilité (Rajkumar, K. *et al.*, 1995; Gay, E. *et al.*, 1997; Hoeflich, A. *et al.*, 1999; Ueki, I. *et al.*, 2000; Dubaquie, Y. *et al.*, 2001; Modric, T. *et al.*, 2001; Zhang, M. *et al.*, 2003; Bienvenu, G. *et al.*, 2004; Salih, D. A. *et al.*, 2004).

Les IGFBP-1, 2, 4, 5 et 6 inhibent la croissance de manière dépendante des IGFs. On suppose un effet de séquestration des IGFs et ainsi une diminution de la quantité d'IGF-1 libre et donc bio-disponible (Gay, E. *et al.*, 1997; Hoeflich, A. *et al.*, 1999; Zhang, M. *et al.*, 2003; Bienvenu, G. *et al.*, 2004; Salih, D. A. *et al.*, 2004; Evdokimova, V. *et al.*, 2012).

De manière générale, la surexpression des IGFBPs est associée à un retard de croissance plus ou moins sévère, indiquant une séquestration potentielle des IGFs (Gay, E. *et al.*, 1997; Hoeflich, A. *et al.*, 1999; Modric, T. *et al.*, 2001; Zhang, M. *et al.*, 2003; Bienvenu, G. *et al.*, 2004; Salih, D. A. *et al.*, 2004). Des retards de croissance intra-utérins avec une perte d'environ 10% du poids à la naissance sont observés dans le cas d'une surexpression des IGFBP-1, 3 à 6, en allant jusqu'à 30% lors d'une surexpression ubiquitaire d'IGFBP-5 (Rajkumar, K. *et al.*, 1995; Modric, T. *et al.*, 2001; Zhang, M. *et al.*, 2003; Bienvenu, G. *et al.*, 2004; Salih, D. A. *et al.*, 2004). Des problèmes de fertilités sont également notifiés avec une altération de l'ovulation, une diminution de la taille des portées, des problèmes de développement fœtaux et une mortalité à la naissance dans le cas de surexpression des IGFBP-1, 3, 5 et 6 **(Tableau 1)** (Gay, E. *et al.*, 1997; Modric, T. *et al.*, 2001; Bienvenu, G. *et al.*, 2004; Salih, D. A. *et al.*, 2004). Enfin, les souris KO pour l'ALS présentent un phénotype modéré avec seulement une diminution de la croissance postnatale (Ueki, I. *et al.*, 2000).

De manière plus spécifique, l'IGFBP-1 est produite essentiellement par le foie et l'endomètre. Elle est connue pour inhiber les effets mitogéniques et hypoglycémiants de l'IGF-1. L'IGFBP-1 est augmentée dans le cas de retard de croissance intra-utérin et est donc négativement associée au poids de naissance (Collett-Solberg, P. F. *et al.*, 2000). Dans ce sens, une surexpression d'IGFBP-1 chez la souris induit une diminution de la croissance *in utero*, des problèmes de fertilité et une altération du métabolisme (diabète et protéinurie) (Gay, E. *et al.*, 1997).

Enfin, l'IGFBP-3 est produite essentiellement par le foie sous contrôle de la GH en période postnatale. Le complexe (IGF-1/IGFBP-3) est capable de former un complexe ternaire avec l'ALS qui protège l'IGFBP-3 de la dégradation par les protéases. L'IGFBP-3 agit comme protecteur de l'IGF-1 et sert de réservoir, ce qui permet sa libération lente au niveau de son récepteur et potentialise ainsi son action. L'IGFBP-3 peut également prévenir les effets hypoglycémiants induits par l'IGF-1 (Collett-Solberg, P. F. *et al.*, 2000).

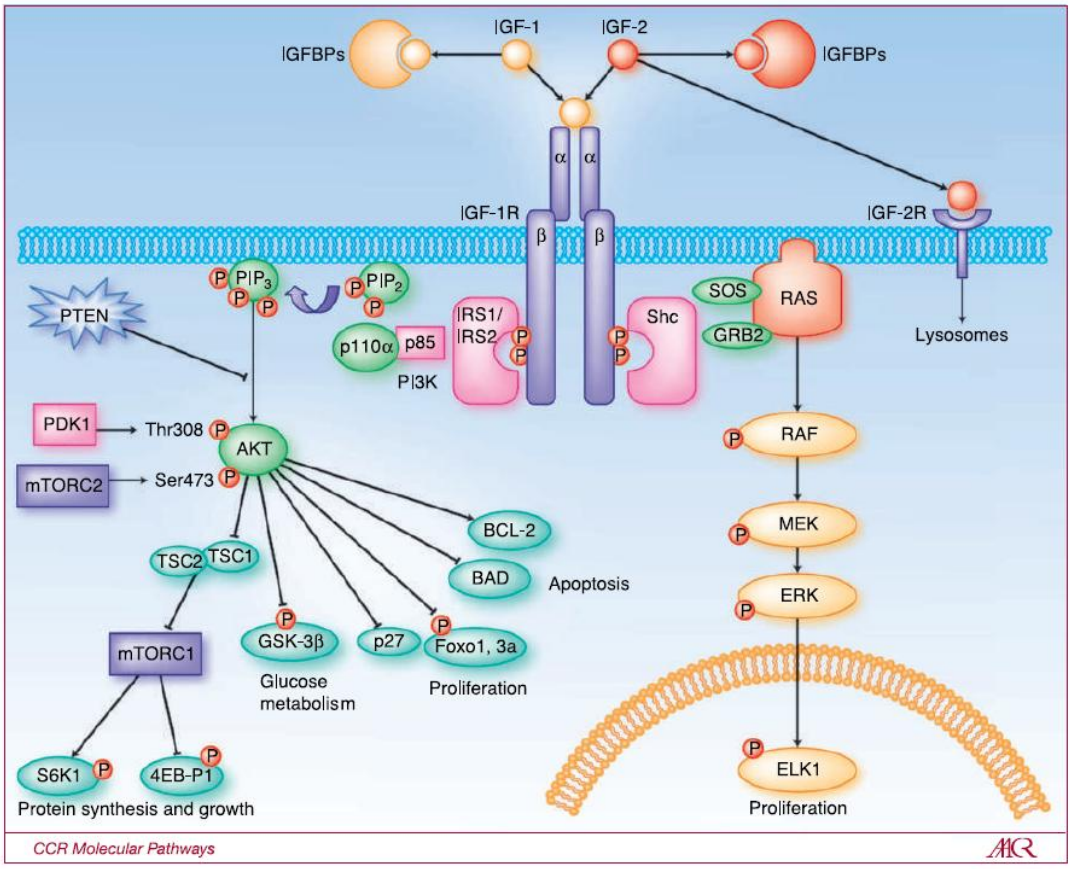

Figure 7 : Représentation schématique des voies de signalisations activées par le système IGF. L'IGF-1R permet d'activer les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK. Ces voies permettent entre autre de transmettre le rôle anti-apoptotique et prolifératif des IGFs. D'après Zha, L. *et al.* (Zha, J. *et al.*, 2010).

L'action des IGFBPs sur la croissance est dépendante des IGFs, mais il existe également un effet indépendant des IGFs décrit pour les différentes IGFBPs (Binoux, M., 1997; Ferry, R. J., Jr. *et al.*, 1999; Wright, R. J. *et al.*, 2002; Sato, Y. *et al.*, 2007; Wheatcroft, S. B. *et al.*, 2009; Bach, L. A. *et al.*, 2013; Baxter, R. C., 2014). De manière générale, les IGFBPs peuvent agir sur des récepteurs spécifiques et être endocytées et transportées dans le noyau. Elles peuvent alors inhiber des facteurs de transcription favorisant la croissance cellulaire. Elles peuvent également induire l'apoptose de manière caspase dépendante (Baxter, R. C., 2014). Ces actions indépendantes des IGFs permettent ainsi de moduler de manière plus fine la croissance (Rosenbloom, A. L., 2007).

D. Voies de signalisations

L'action des IGFs sur l'IGF-1R active les voies de signalisations PI3K/AKT et MAPK (*mitogen activade protein kinase)*. L'activation d'IGF-1R par son ligand induit son autophosphorylation, ce qui permet la fixation des protéines adaptatrices IRS-1 (*insulin receptor substrate*), IRS-2 et Shc (*SRC homology 2 domain containing transforming protein*) **(Figure 7)** (Zha, J. *et al.*, 2010).

La fixation d'IRS-1,2 active la sous unité régulatrice p85 de la PI3K (*phosphatidyl inositol 3' kinase*) dont la sous-unité catalytique p110 convertit le PiP2 (*phosphatidyl inositol diphosphate*) en PiP3 (*phosphatidyl inositol triphosphate*). Cela permet ensuite la phosphorylation d'AKT (*AGC kinase*) par PDK1 (*phophoinositide dependant protein kinase 1*) et mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*). AKT régule plusieurs évènements cellulaires comme la désinhibition du complexe mTORC1 et augmente la synthèse protéique et la croissance cellulaire. De plus, AKT, *via* l'inhibition de GSK-3β (*glycogen synthase kinase*), stimule entre autres la glycogénogénèse. De plus, il augmente la prolifération et la survie par une modulation des facteurs de transcriptions Foxo, p27, BCL2 (*B cell lymphoma 2*) et BAD (*BCL2 associated agonist of cell death*) (Zha, J. *et al.*, 2010).

D'autre part, la fixation de Shc à l'IGF-1R permet le recrutement de GRB2 (*growth factor receptor bound protein 2*) qui s'associe à SOS (*son of sevenless*) et active RAS (*rat sarcoma*), ce qui permet la phophorylation en cascade de la voie des MAPKs incluant RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*, ou *MAP3K*), MEK (MAPK/ERK kinase*, ou MAP2K*) et ERK 1, 2

(*Extracellular signal-regulated kinase* 1, 2, ou *MAPK3, 1 respectivement*). Cette voie active entre autres, la prolifération cellulaire (Zha, J. *et al.*, 2010).

De plus, on distingue des boucles de rétrocontrôles négatives au sein de ces voies de signalisations. Ainsi ERK peut inhiber RAF, MEK et SOS, tandis que S6K (*S6 kinase*) peut inhiber mTORC2 et PI3K. De plus, ces deux voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK peuvent également interagir entres elles et s'autoréguler (Mendoza, M. C. *et al.*, 2011). Dans ce sens, on distingue des boucles d'inter-activations avec ERK pouvant stimuler mTORC1 et RAS pouvant activer la PI3K. Il existe également des boucles d'inter-inhibions avec AKT pouvant inhiber RAF, tandis que ERK pourrait inhiber le recrutement de la PI3K (Mendoza, M. C. *et al.*, 2011).

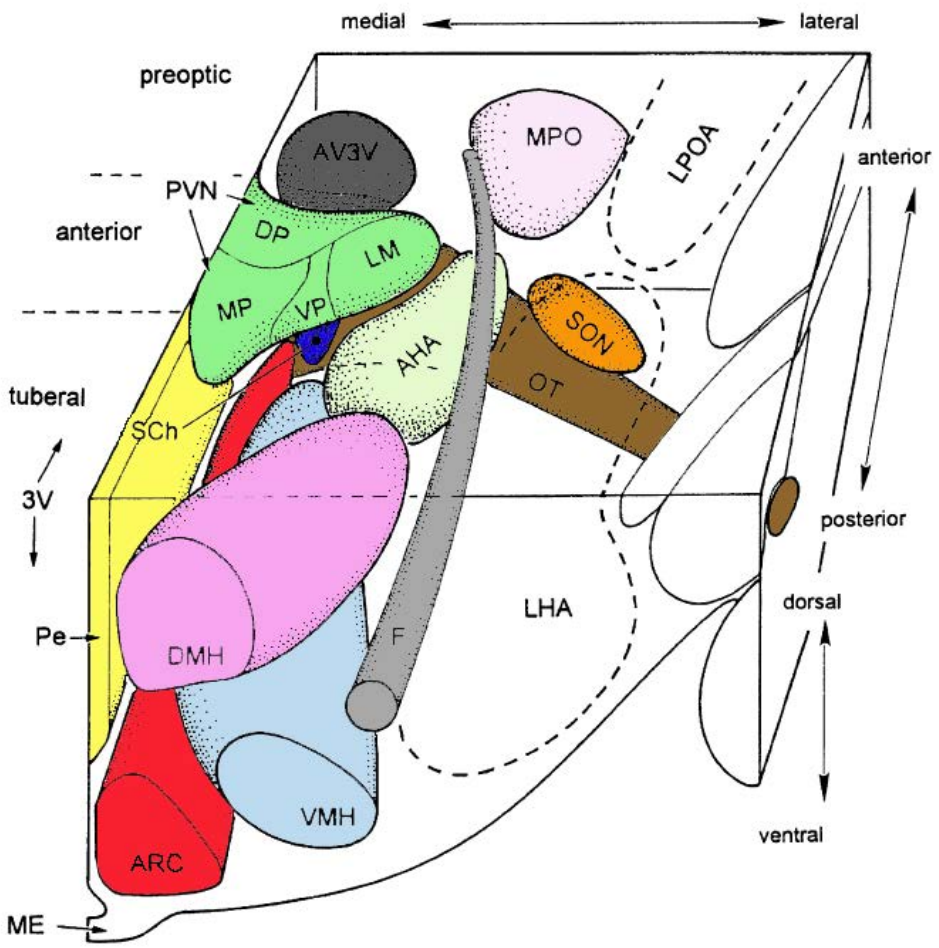

Figure 8 : Organisation tridimensionnelle des noyaux majeurs de l'hypothalamus.

Abréviations : 3V, 3ème ventricule ; AHA, aire hypothalamique antérieure ; ARC, noyau arqué ; AV3V, aire antéro-ventrale du 3ème ventricule ; DP, sous-noyau parvocellulaire dorsal du noyau paraventriculaire (PVN) ; DMH, noyau dorso-médian ; F, fornix ; LHA, aire latérale hypothalamique ; LM, sous-noyau magnocellulaire latéral du noyau paraventriculaire (PVN) : LPOA, aire latérale préoptique; ME, éminence médiane ; MP, sous-noyau parvocellulaire médian du PVN ; MPO, aire préoptique médiane ; Pe / PeV, noyau périventriculaire ; OT, tractus optique ; SCh, noyau suprachiasmatique ; SON, noyau supraoptique; VMH, noyau ventromédian ; VP, sous-noyau parvocellulaire ventral du PVN. Adapté de Berthoud, H. R. (Berthoud, H. R., 2002).

II. Le complexe hypothalamo-hypophysaire

Comme il a été dit précédemment, les IGFs sont très fortement impliqués dans la croissance périnatale de l'organisme, et l'IGF-1 a également été impliqué dans la croissance postnatale, notamment sous le contrôle de l'hormone de croissance. L'IGF-1 fait ainsi partie intégrante de l'axe somatotrope en période postnatale. Chez l'adulte, l'IGF-1 circulant est majoritairement produit par le foie en réponse à l'hormone de croissance, qui est sécrétée par l'hypophyse sous le contrôle de neuropeptides de l'hypohalamus.

A. Neuroanatomie

1. Hypothalamus

L'hypothalamus est situé dans la partie ventrale du diencéphale au niveau du 3ème ventricule. L'hypothalamus s'étend de l'aire préoptique aux corps mamillaires et est constitué de plusieurs noyaux aux rôles distincts. L'hypothalamus médio-basal est ainsi subdivisé en plusieurs noyaux et aires : le noyau arqué (ARC), périventriculaire (PeV), paraventriculaire (PVN), dorsomédian (DMH), ventromédian (VMH), les aires préoptiques antérieures (POA) et l'aire latérale hypothalamique (LHA). Il est également constitué de l'éminence médiane (ME) **(Figure 8)** (Berthoud, H. R., 2002).

L'hypothalamus régule de nombreuses fonctions de l'organisme et joue un rôle intégrateur par l'intermédiaire de ses nombreuses afférences et efférences. Ainsi, il intègre de nombreuses informations en provenance des systèmes limbiques, du cortex, des nerfs optiques, du nerf vague *etc.*, ce qui est facilité par sa localisation centrale au niveau du cerveau (Berthoud, H. R., 2002). L'hypothalamus est ainsi impliqué dans les régulations nerveuses mais également endocriniennes. Les régulations endocriniennes sont réalisées par l'innervation de l'éminence médiane et de la posthypophyse. Les neurones de l'hypothalamus impliqués dans cette régulation endocrinienne sont de deux types : les neurones magnocellulaires (de grandes tailles) localisés dans le PVN et le noyau supraoptique (SON), et les neurones parvocellulaires (de petites tailles) localisés dans l'ARC, le PeV, le PVN, le POA, *etc*. Les neurones magnocellulaires projettent directement vers le lobe postérieur de l'hypophyse et sécrètent leurs hormones dans le sang, tandis qu'une partie des neurones

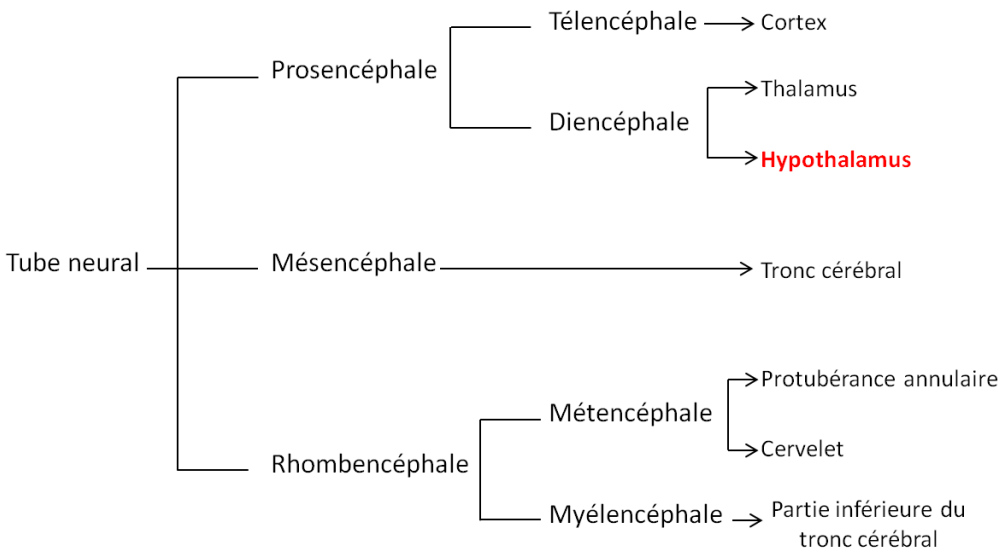

Figure 9 : Représentation schématique du développement embryonnaire du cerveau. Le tube neural forme le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Le prosencéphale se divise ensuite en télencéphale et en diencéphale. Ce dernier forme ensuite le thalamus et l'hypothalamus.

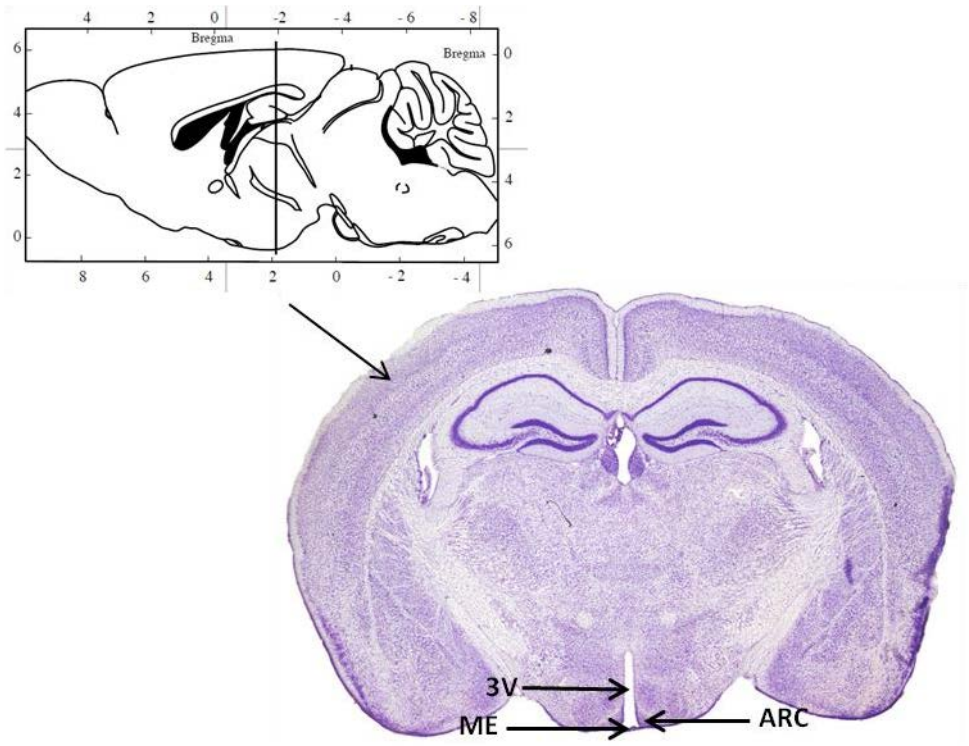

Figure 10 : Coloration au crésyl violet d'une coupe coronale de cerveau murin. Abréviations : 3V, 3ème ventricule ; ARC, noyau arqué ; ME, éminence médiane. Ces zones ont été mises en évidence grâces aux flèches noires. Adapté de The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (George Paxinos, K. B. J. F., 2001).

parvocellulaires sécrètent des facteurs stimulateurs ou inhibiteurs au niveau de l'éminence médiane, dans le réseau capillaire du système porte, afin de contrôler la sécrétion hormonale par les cellules du lobe antérieur de l'hypophyse (Musumeci, G. *et al.*, 2015).

L'hypothalamus se forme précocement lors du développement fœtal. Il est issu de la partie rostrale de l'épithélium neural (Rizzoti, K. *et al.*, 2011) : le tube neural s'allonge pour former le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale à $E_{10.5}$ chez le rat et $E_{7.5}$ chez la souris. Le prosencéphale se divise ensuite en télencéphale et en diencéphale, ce dernier donnant naissance au thalamus et à l'hypothalamus à $E_{13.5}$ chez le rat et $E_{9.5}$ chez la souris **(Figure 9)** (Markakis, E. A., 2002).

Le développement de l'hypothalamus se fait selon un processus dit « *outside-in* » : les neurones hypothalamiques sont formés au niveau du troisième ventricule et sont poussés vers les positions latérales par l'arrivée des neurones suivants. Ainsi, les noyaux les plus éloignés du 3ème ventricule sont formés de façon plus précoce que les neurones situés à proximité du 3ème ventricule (Caqueret, A. *et al.*, 2006). Dans ce sens, la mise en place de l'aire hypothalamique latérale (LHA) chez le rat se fait à partir du 13ème jour embryonnaire ($E_{13,5}$) tandis que le noyau arqué (ARC) débute à $E_{15,5}$. De la même manière, les neurones situés au niveau latéral au sein du noyau arqué sont formés de manière plus précoce que les neurones plus médians (Markakis, E. A., 2002; Caqueret, A. *et al.*, 2006). Chez les rongeurs, le développement de l'hypothalamus se prolonge pendant les premières semaines de vie postnatale (Kappeler, L. *et al.*, 2009; Bouret, S. G., 2010).

2. Eminence médiane

Une partie des neurones hypothalamiques à fonction endocrine projettent leurs axones au niveau de l'éminence médiane. Celle-ci se situe au niveau ventral du troisième ventricule (ME, *median eminence*) **(Figure 10)**. L'éminence médiane appartient aux organes circumventriculaires et ne présente pas de barrière hémato-encéphalique. C'est un lieu idéal pour la communication entre les organes périphériques et les neurones de l'hypothalamus (Hideshi, K. Y., Yamaguchi; Haruko, Uemura, 2012). L'éminence médiane

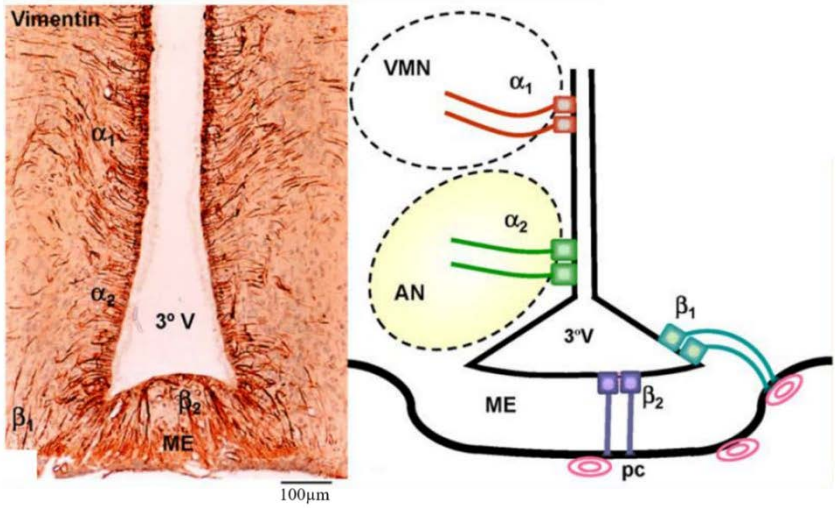

Figure 11 : Coupe coronale d'un hypothalamus de rat au niveau de l'éminence médiane. Un immunomarquage des tanycytes avec la vimentine est représenté à gauche et les 4 sous-populations de tanycytes, α_1, α_2, β_1 et β_2, sont illustrées à droite. Abréviations : 3°V, 3ème ventricule ; AN, noyau arqué ; ME, éminence médiane ; pc, capillaires du système porte ; VMN, noyau ventro-médian. D'après Rodríguez, EM. *et al.* (Rodriguez, E. M. *et al.*, 2010).

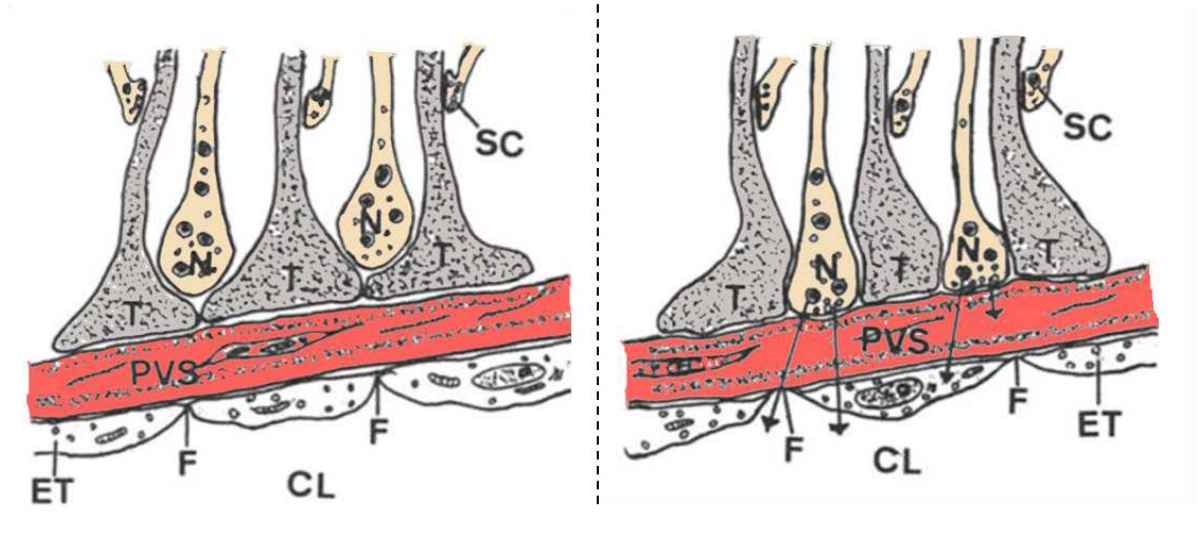

Figure 12 : Illustration du pôle basal des tanycytes β au niveau de l'éminence médiane. Outre la fonction de barrière et de transporteurs sélectifs, les tanycytes peuvent également réguler l'accès des terminaisons axonales aux capillaires. Abréviations : CL, lumière des capillaires ; ET, cellules endothéliales ; F, fenestration ; N, terminaisons nerveuses ; PVS, espace périvasculaire ; SC, contact synaptique ; T, tanycyte. Adapté de Kobayashi, H. *et al.* (Hideshi, K. Y., Yamaguchi; Haruko, Uemura, 2012).

est vascularisée par le réseau capillaire primaire du système porte, qui irrigue la *pars distalis* de l'adénohypophyse. Les neuropeptides hypothalamiques sont libérés dans l'éminence médiane au niveau du système porte, qui va ensuite irriguer l'hypophyse antérieure. L'éminence médiane est donc la région de l'hypothalamus contenant les projections d'axones hypothalamiques transportant les facteurs hypophysiotropes.

L'éminence médiane contient également des tanycytes. Les tanycytes sont des cellules épendymales qui jouent le rôle de barrière hémato-encéphalique au niveau de l'éminence médiane, et qui permettent des échanges contrôlés entre le sang et le liquide céphalorachidien (LCR). On distingue les tanycytes β situés sur le plancher du 3ème ventricule de l'hypothalamus (β_1 et β_2) (Hideshi, K. Y., Yamaguchi; Haruko, Uemura, 2012). Le pôle apical des tanycytes β présente un contact avec le LCR du 3ème ventricule tandis que le pôle basal forme un contact avec le réseau capillaire primaire du système porte **(Figure 11)**. L'éminence médiane présente des échanges sélectifs facilités avec le système porte constitué de capillaires fenestrés grâce aux tanycytes β2. Les tanycytes β_1 séparent l'éminence médiane et le noyau arqué (Rodriguez, E. M. *et al.*, 2010).

Les tanycytes ont un rôle de barrière, de régulateur et d'intégrateur des informations circulantes (Ojeda, S. R. *et al.*, 2008; Prevot, V. *et al.*, 2013). Les tanycytes β2 peuvent notamment promouvoir les transports hormonaux du sang au LCR. Ces cellules expriment des marqueurs de l'endocytose comme la N-Cadhérine et la Calvéoline 1 (Rodriguez, E. M. *et al.*, 2010; Balland, E. *et al.*, 2014). Des études réalisées chez la souris ont ainsi montré que la leptine peut transiter de manière polarisée dans les tanycytes. Ainsi, la leptine est internalisée par l'intermédiaire du récepteur à la leptine dans les prolongements tanycytaires, transite jusqu'au pôle apical des tanycytes β2 afin d'être libérée dans le 3ème ventricule, puis diffuse librement dans le noyau arqué (Balland, E. *et al.*, 2014). De plus, les tanycytes β2 peuvent présenter dans certains cas une plasticité permettant de faciliter les contacts physiques entres les terminaisons axonales et la paroi des capillaires fenestrés **(Figure 12)**. En effet, le pôle basal des tanycytes β_2 s'étend sur les capillaires limitant ainsi les connexions directes entre les terminaisons axonales et les capillaires. Il a notamment été montré pour les neurones gonadotropes, qui sécrètent le GnRH (*gonadotropin releasing hormone*) au niveau de l'éminence médiane, que les tanycytes β_2 peuvent se rétracter en période pré-ovulatoire en présence d'une forte concentration en œstrogène afin de favoriser les interactions

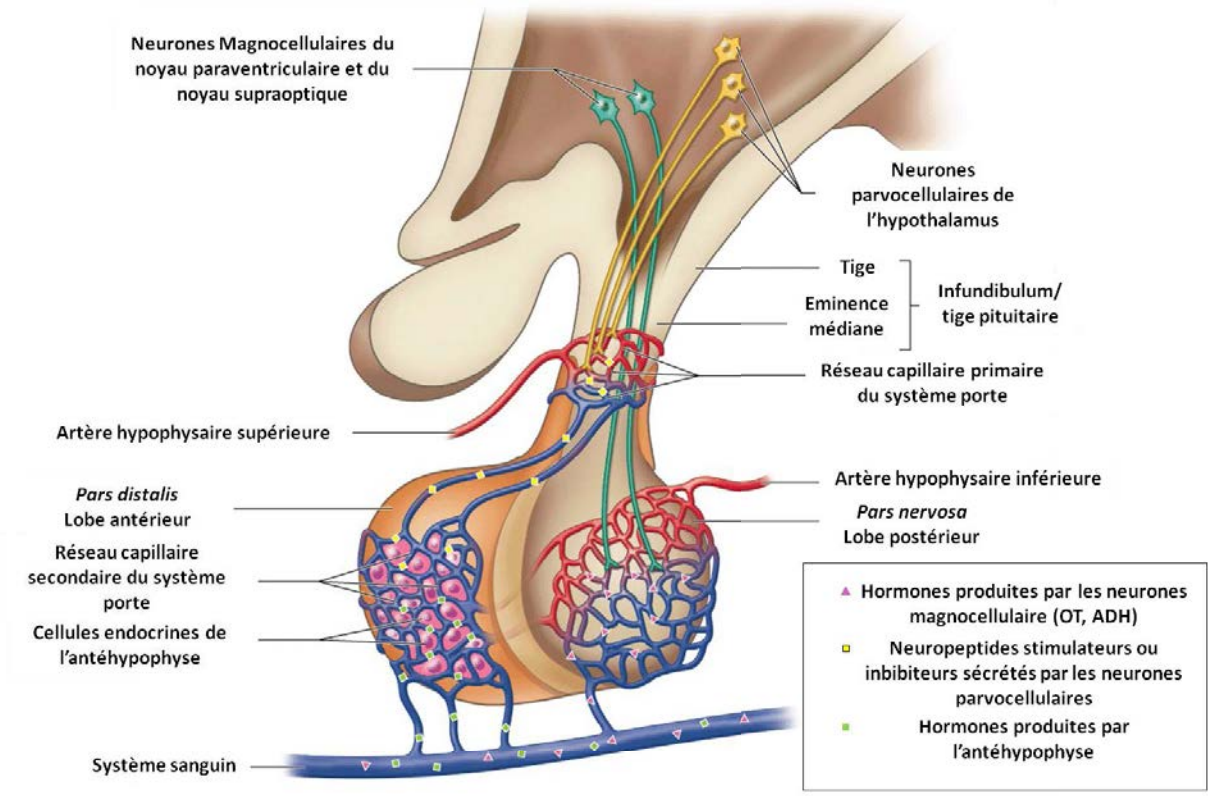

Figure 13 : Représentation du complexe hypothalamo-hypophysaire. Les neurones magnocellulaires projettent au niveau du lobe postérieur de l'hypophyse, tandis que les neurones parvocellulaires innervent l'éminence médiane au niveau du système porte. Abréviations : ADH, vasopressine ; OT, ocytocine. Adapté de Mescher A, L. (Mescher, A.).

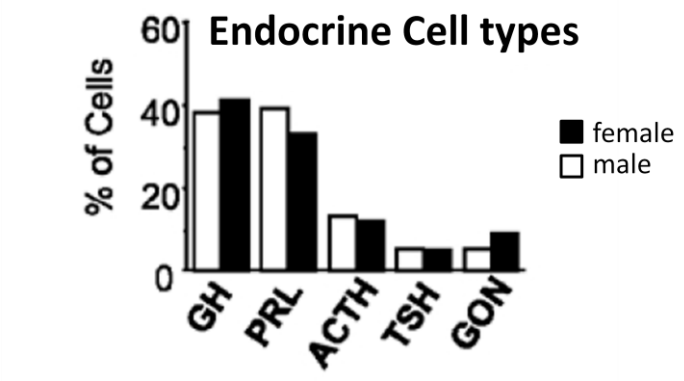

Figure 14 : Représentation en pourcentage des différents types cellulaires de l'antéhypophyse chez les souris mâles et femelles. Abréviations : ACTH, cellules corticotropes ; GH, cellules somatotropes ; GON, cellules gonadotropes ; PRL, cellules lactotrope ; TSH, cellules thyréotropes. D'après Núñez, L. *et al.* (Nunez, L. *et al.*, 2003).

axones/capillaires. Les tanycytes permettent ainsi de réguler la sécrétion des neurotransmetteurs (Ojeda, S. R. *et al.*, 2008; Hideshi, K. Y., Yamaguchi; Haruko, Uemura, 2012; Goodman, T. *et al.*, 2015).

On distingue également des tanycytes α localisés sur la paroi inféro-latérale du troisième ventricule (α1 et α2) permettant les échanges entre le LCR et les neurones. L'importance de ces tanycytes a été notamment observée dans le transport de la leptine du LCR aux noyaux ventromédians (VMH) et dorsomédians (DMH) (Balland, E. et al., 2014).

3. L'hypophyse

L'hypophyse ou glande pituitaire est située au niveau de la selle turcique sur l'os sphénoïde. Chez les rongeurs, l'hypophyse est divisée en 3 lobes : un lobe antérieur (ou antéhypophyse), un lobe intermédiaire et un lobe postérieur (ou posthypophyse). L'hypophyse est reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire. On ne distingue pas de lobe intermédiaire chez l'homme (Musumeci, G. *et al.*, 2015). Le lobe postérieur de l'hypophyse est constitué essentiellement de cellules de soutien et d'extensions des neurones magnocellulaires hypothalamiques. L'antéhypophyse est quant à elle majoritairement constituée de cellules endocrines dont la sécrétion est régulée par les facteurs stimulateurs ou inhibiteurs sécrétés par les neurones parvocellulaires, au niveau de l'éminence médiane **(Figure 13)** (Musumeci, G. *et al.*, 2015).

Au cours du développement fœtal, le stomodeum ectodermique de l'embryon forme une excroissance antérieure à la membrane buccopharyngée, formant ainsi la poche de Rathke. Cette dernière se sépare de la cavité buccale et forme l'adénohypophyse. Une évagination du diencéphale donne naissance à la neurohypophyse (ainsi qu'à l'hypothalamus) (Rosenbloom, A. L., 2007; Rizzoti, K. *et al.*, 2011).

L'antéhypophyse est constituée de plusieurs grands types de cellules endocrines **(Figure 14)** : les cellules somatotropes, lactotropes, corticotropes, thyréotropes et gonadotropes qui sécrètent respectivement l'hormone de croissance, la prolactine,

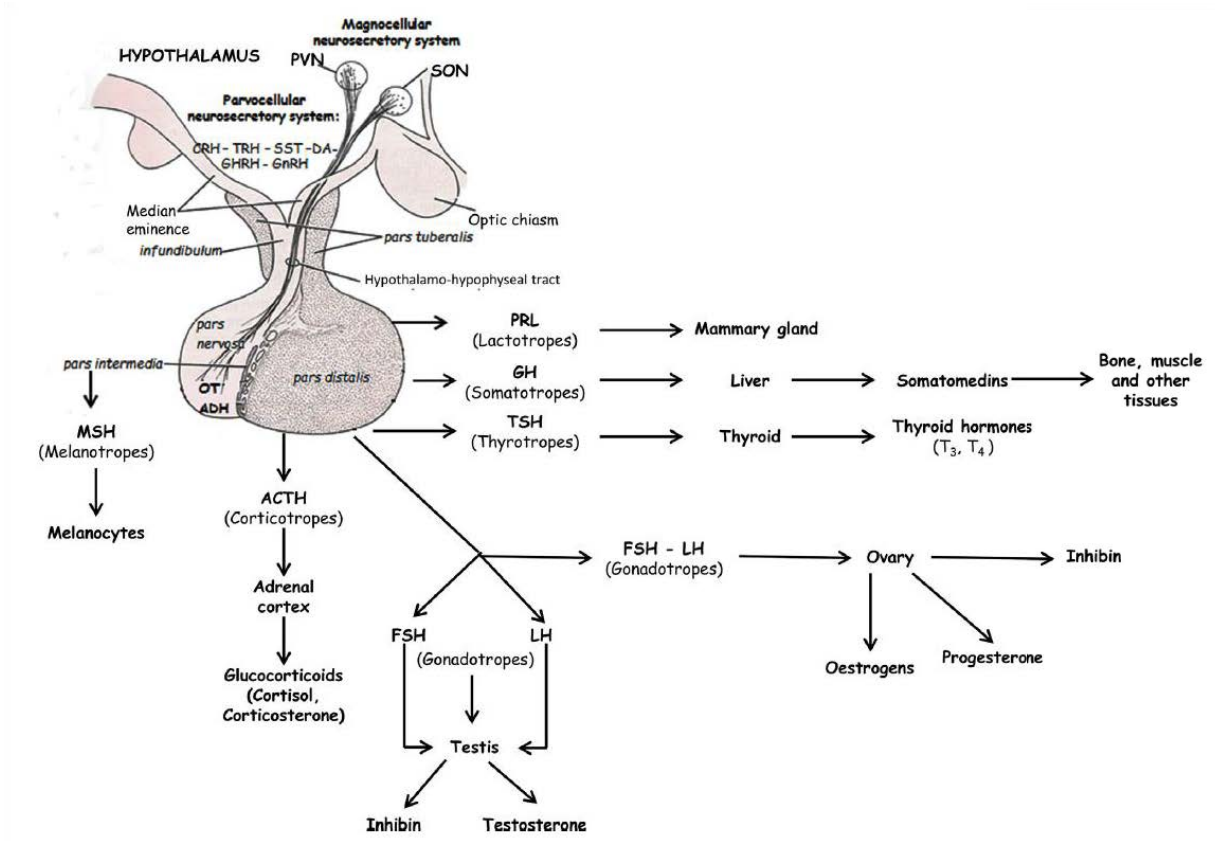

Figure 15 : Représentation du complexe hypothalamo-hypophysaires et de leurs organes cibles. On distingue les sécrétions de la posthypophyse et celle de l'antéhypophyse qui contient l'axe somatotrope (GHRH, SST, GH, somatomédines/IGFs), l'axe thyréotrope (TRH, TSH, T3, T4), l'axe gonadotrope (GnRH, LH, FSH, stéroïdes sexuels), l'axe corticotrope (CRH, ACTH, glucocorticoïdes) et l'axe lactotrope (DA, PRL). Abréviations : ACTH, adrénocorticotrophine ; ADH, vasopressine ; CRH, corticolibérine ; DA, dopamine ; FSH, hormone folliculo-stimulante ; GH, hormone de croissance ; GHRH, somatolibérine ; GnRH, gonadolibérine ; LH, hormone lutéinisante ; MSH, mélanocortine ; OT, ocytocine ; PRL, prolactine ; PVN, noyau paraventriculaire ; SON, noyau supraoptique ; SST=SRIH, somatostatine ; TRH, thyréolibérine ; TSH, thyréostimuline. D'après Musumeci, G. *et al.* (Musumeci, G. *et al.*, 2015).

l'adrénocorticotrophine, la thyréostimuline, et enfin l'hormone lutéinisante et l'hormone folliculo-stimulante. Entre 80 et 88% des cellules endocrines de l'antéhypophyse sont constituées à part égale des cellules somatotropes et des cellules lactotropes (Nunez, L. *et al.*, 2003). La majeure partie des cellules endocrines de l'antéhypophyse ne sécrètent qu'une seule hormone. Seul 0.6% à 1.8% d'entre elles sont multifonctionnelles, c'est-à-dire pouvant co-sécréter plusieurs hormones. De plus, certaines cellules endocrines présentent différents récepteurs aux neuropeptides hypothalamiques et sont ainsi sensibles à plusieurs neuropeptides (Nunez, L. *et al.*, 2003). Dans le cas des cellules somatotropes, 93% sont mono-hormonales, les 7% restants pouvant majoritairement co-sécréter la prolactine (Nunez, L. *et al.*, 2003). La stimulation des récepteurs des neuropeptides hypothalamiques engendre une augmentation de la concentration du calcium cytosolique des cellules endocrines, induisant ainsi la libération de leur hormone (Nunez, L. *et al.*, 2003). Les cellules sont interconnectées, ce qui permet la génération d'un pic hormonale dans la circulation sanguine.

L'antéhypophyse est également constituée de cellules folliculo-stellaires qui représentent 5 à 10% des cellules hypophysaires (Devnath, S. *et al.*, 2008). Ces cellules sont interconnectées par des jonctions gaps et peuvent faciliter la coordinnation de la dépolarisation des cellules endocrines de l'antéhypophyse par propagation du courant calcique (Soji, T. *et al.*, 1997; Herkenham, M., 2005; Devnath, S. *et al.*, 2008; Hodson, D. J. *et al.*, 2012). Les cellules folliculo-stellaires sont également impliquées dans le système immunitaire et sont capables de sécréter des cytokines comme l'IL-6 et présentent également un rôle de phagocytose. Les cellules folliculo-stellaires coordonnent ainsi la réponse des cellules endocrines avec le système immunitaire (Herkenham, M., 2005).

B. Fonctions hypothalamo-hypophysaires

1. Axes hypothalamo-hypophysaires

Une grande partie des régulations des grandes fonctions de l'organisme se fait par une régulation hormonale. Le complexe hypothalamo-hypophysaire permet la centralisation et le contrôle de certaines sécrétions endocrines. On distingue les sécrétions post-hypophysaires et anté-hypophysaires **(Figure 15)**.

a. Neurones magnocellulaires et posthypophyse

Les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus produisent la vasopressine et l'ocytocine (Leng, G. *et al.*, 2015). Ces neurones magnocellulaires synthétisent leurs hormones au niveau de leurs corps cellulaires. Les hormones sont ensuite stockées dans les corps de Herring au niveau des terminaisons axonales, situées directement dans la posthypophyse, et sont sécrétées dans l'artère hypophysaire inférieure (Musumeci, G. *et al.*, 2015).

La vasopressine (ou hormone antidiurétique (ADH)) est responsable du contrôle de l'osmolarité et du volume sanguin, régulant ainsi la pression artérielle (Connell, J. M. *et al.*, 1987). Le métabolisme hydrique et la balance des électrolytes sont ainsi régulés par le noyau supraoptique (SON) et le noyau paraventriculaire (PVN). La vasopressine régule entre autres la réabsorption d'eau et d'électrolytes par le rein au niveau des tubules collecteurs (Leng, G. *et al.*, 2015; Andrew Sharman, J. L., 2016).

L'ocytocine est une hormone impliquée dans la reproduction. Elle a notamment été impliquée dans le comportement sexuel (Garrison, J. L. *et al.*, 2012), l'accouplement et l'éjaculation. Elle a également été impliquée dans les contractions du myomètre de l'utérus au cours de la parturition et dans les contractions des glandes mammaires lors de la lactation (Veening, J. G. *et al.*, 2015). L'ocytocine pourrait également stimuler la sécrétion de prolactine importante pour la lactogenèse (Kennett, J. E. *et al.*, 2012). De plus, l'ocytocine a également un rôle au niveau central et permet de favoriser la relation mère/enfant (Zik, J. B. *et al.*, 2015).

b. Neurones parvocellulaires et antéhypophyse

On distingue cinq axes hypothalamo-hypophysaires : l'axe somatotrope, l'axe thyréotrope, l'axe gonadotrope, l'axe corticotrope et l'axe lactotrope **(Figure 15)**. Il existe un rétrocontrôle négatif des différentes hormones des ces axes ce qui maintient un contrôle fin de ces derniers. Nous allons principalement nous focaliser sur l'axe somatotrope qui représente une partie essentielle de cette thèse.

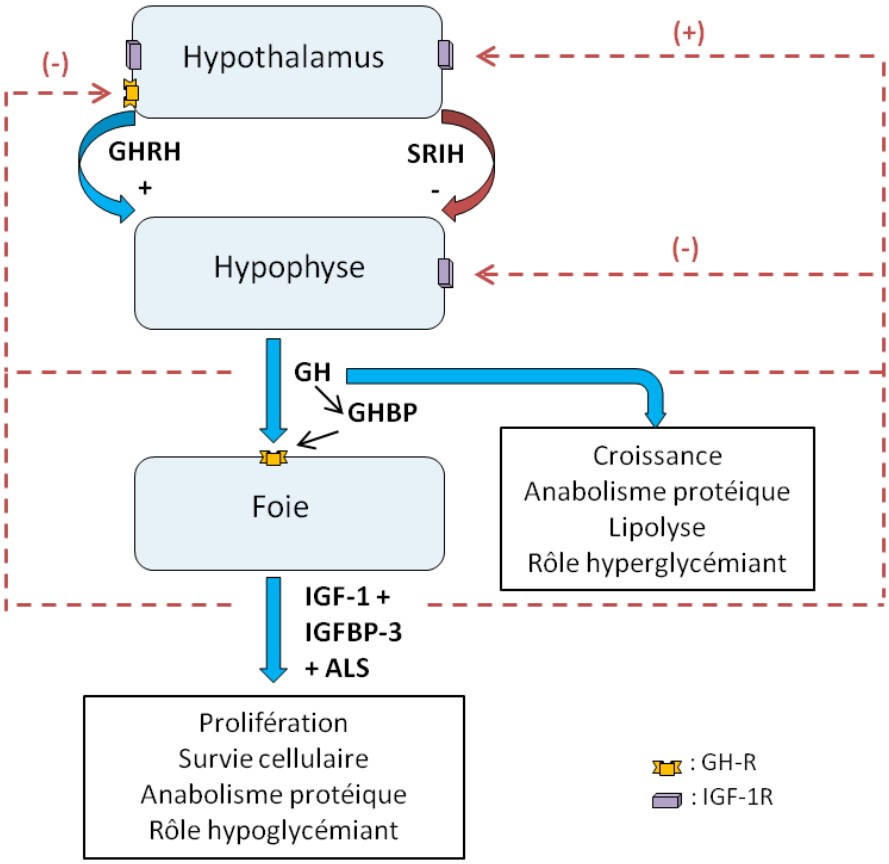

Figure 16 : Représentation de l'axe somatotrope. Le GHRH hypothalamique active la sécrétion de GH hypophysaire tandis que le SRIH hypothalamique l'inhibe. La GH a une action directe sur la croissance et le métabolisme par l'intermédiaire de son récepteur. La GH stimule également la sécrétion d'IGF-1, d'ALS et d'IGFBP-3 majoritairement au niveau hépatique (70% de l'IGF-1 circulante est d'origine hépatique (Sjogren, K. *et al.*, 2002; Yakar, S. *et al.*, 2004)). Il existe une boucle de rétrocontrôle négative de la GH et de l'IGF-1 au niveau hypothalamique et hypophysaire. Il existe également des rétrocontrôles entre le GHRH et le SRIH, ainsi que des autorégulations de la GH, du GHRH et du SRIH qui ne sont pas représentées sur ce schéma dans un souci de clarté. Abréviations : ALS, *acide labile subunit* ; GH, hormone de croissance ; GHBP, GH *binding protein* ; GH-R, GH récepteur ; GHRH, *growth hormone releasing hormone* ; IGF-1 *insulin like growth factor 1* ; IGF-1R, récepteur de type 1 aux IGFs ; IGFBP3, *IGF binding protein 3* ; SRIH, somatostatine.

α. L'axe somatotrope

Composition

De manière globale, la GH (*Growth Hormone*) est sécrétée de manière pulsatile par l'adénohypophyse et sa sécrétion est finement régulée par deux neurohormones hypothalamiques antagonistes sécrétées en phase inverse au niveau du système porte hypophysaire : le GHRH (somatolibérine, *Growth Hormone Releasing Hormone*), activateur, et le SRIH (somatostatine, *Somatotropin Release Inhibiting Hormone*), inhibiteur **(Figure 16)**. L'hormone de croissance active son récepteur GHR (*growth hormone receptor*) et stimule la sécrétion d'IGF-1 hépatique, qui devient alors la source majoritaire de l'IGF-1 circulant. La GH stimule également la transcription et la sécrétion hépatique d'IGFBP-3 et d'ALS. L'IGFBP-3 est produit par les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer tandis que l'IGF-1 et l'ALS sont produits par les hépatocytes (Collett-Solberg, P. F. *et al.*, 2000). Il existe un rétrocontrôle négatif, indispensable pour assurer une régulation fine de cet axe. En effet, la GH et l'IGF-1 ont une action inhibitrice au niveau hypothalamique et hypophysaire. On distingue également des rétrocontrôles entre le GHRH et le SRIH, ainsi que des autorégulations de la GH, du GHRH et du SRIH (Steyn, F. J. *et al.*, 2016). Ces différents éléments constituent l'axe somatotrope (Bluet-Pajot, M. T. *et al.*, 1998; Bluet-Pajot, M. T. *et al.*, 2001; Chowen, J. A. *et al.*, 2004).

Plus spécifiquement, la somatolibérine (GHRH) est un neuropeptide produit par les neurones à GHRH situés dans le noyau arqué de l'hypothalamus (Chowen, J. A. *et al.*, 2004). Ces neurones neuroendocriniens de type parvocellulaire projettent vers l'éminence médiane où la somatolibérine est sécrétée au niveau des capillaires du système porte, qui irriguent ensuite l'antéhypophyse, et stimule la sécrétion de la GH.

La somatostatine (SRIH) est largement distribuée au sein du système nerveux central et en périphérie au sein du tractus digestif et du pancréas. Au niveau de l'hypothalamus, la majorité des neurones à SRIH sont localisés au niveau du noyau périventriculaire (PeV) (Dournaud, P. *et al.*, 1992). Ces neurones projettent au niveau de l'éminence médiane, où la somatostatine est également sécrétée dans le système porte hypophysaire et permet l'inhibition de la sécrétion de GH par les cellules somatotropes de l'antéhypophyse (Chowen, J. A. *et al.*, 2004).

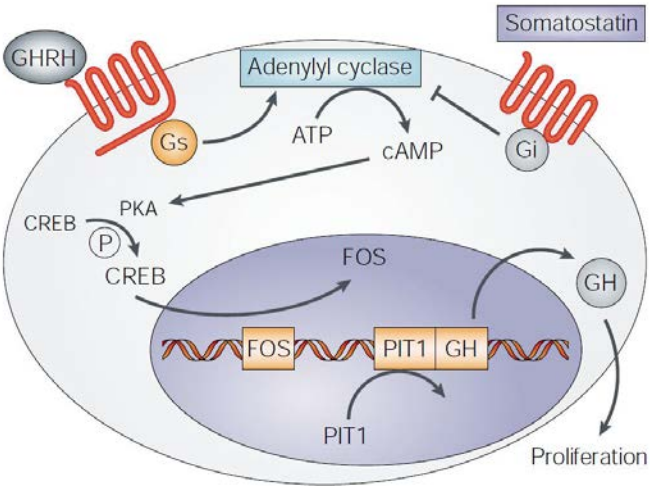

Figure 17 : Action régulatrice du GHRH et du SRIH sur la sécrétion de GH par les cellules somatotropes. Le GHRH stimule la formation d'AMP cyclique qui active la PKA (protein kinase A). Celle-ci phosphoryle ensuite le facteur de transcription CREB. Ce dernier stimule la transcription de PIT1 et ainsi la prolifération des cellules somatotropes, ainsi que la sécrétion de GH. Abréviations : ATP, adénosine triphosphate ; cAMP, adénosine monophosphate cyclique ; CREB, cAMP response element binding protein ; FOS, *FBJ osteosarcoma oncogene* ; GH, *growth hormone* ; GHRH, *growth hormone releasing hormone* ; Gi, protéine G inhibitrice ; Gs, protéine G stimulatrice ; PIT1, *Pituitary specific positive transcription factor 1* ; PKA, protéine kinase A. D'après Asa, S. L. *et al.* (Asa, S. L. *et al.*, 2002).

Le récepteur GHRH (*growth hormone releasing hormone receptor,* GHRH-R) est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (Asa, S. L. *et al.*, 2002).La fixation du GHRH induit le changement de conformation de la protéine G stimulatrice, ce qui permet l'activation de l'AC (*adenylyl cyclase*) qui génère l'AMP cyclique à partir de l'ATP **(Figure 17)**. L'AMPc active alors la protéine kinase A (PKA), qui induit la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding). Cette dernière permet d'activer les facteurs de transcriptions FOS et PIT1 (Melmed, S., 2009). PIT1 (POU1F1, *Pituitary specific positive transcription factor 1*) est un facteur de transcription crucial pour l'expression et la régulation des gènes de l'hormone de croissance et de la prolactine (Gonzalez-Parra, S. *et al.*, 1996; Ezzat, S. *et al.*, 2005). La stimulation du GHRH-R engendre une augmentation de la concentration calcique cytosolique dans les cellules somatotropes, ce qui engendre la libération de la GH (Nunez, L. *et al.*, 2003). L'action de la somatostatine est quant à elle régulée par six récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G inhibitrices (SST1, SST2A, SST2B, SST3, SST4 et SST5), qui inhibent la synthèse d'AMPc par l'AC (Asa, S. L. *et al.*, 2002; Viollet, C. *et al.*, 2008). Seuls les récepteurs SST1, SST2 et SST5 sont impliqués au niveau hypophysaire dans l'inhibition de la sécrétion de GH. De plus une partie des neurones à GHRH du noyau arqué expriment les messagers des récepteurs SST1 et SST2, ce qui permet le rétrocontrôle du GHRH par SRIH (Beaudet, A. *et al.*, 1995).

Les cellules somatotropes représentent 40% des cellules de l'antéhypophyse (Nunez, L. *et al.*, 2003). Les cellules somatotropes sont organisées et connectées entres elles par des jonctions adhérentes et forment ainsi un réseau tridimensionnel qui pourrait permettre une dépolarisation et une sécrétion de GH de manière coordonnée (Bonnefont, X. *et al.*, 2005; Waite, E. *et al.*, 2010). La formation de ce réseau durant la période postnatale est un élément crucial pour la formation du pic de sécrétion de GH au niveau sanguin ((Le Tissier, P. R. *et al.*, 2012).

Environ 50% de la GH qui est sécrétée circule à l'état libre, le reste étant principalement lié à la GHBP (*Growth Hormone Binding Protein*). La GHBP est le produit protéolytique de la partie extracellulaire du GHR (*Growth Hormone Receptor*). Elle permet de favoriser le transport de la GH. Cependant elle présente une affinité moins grande avec la

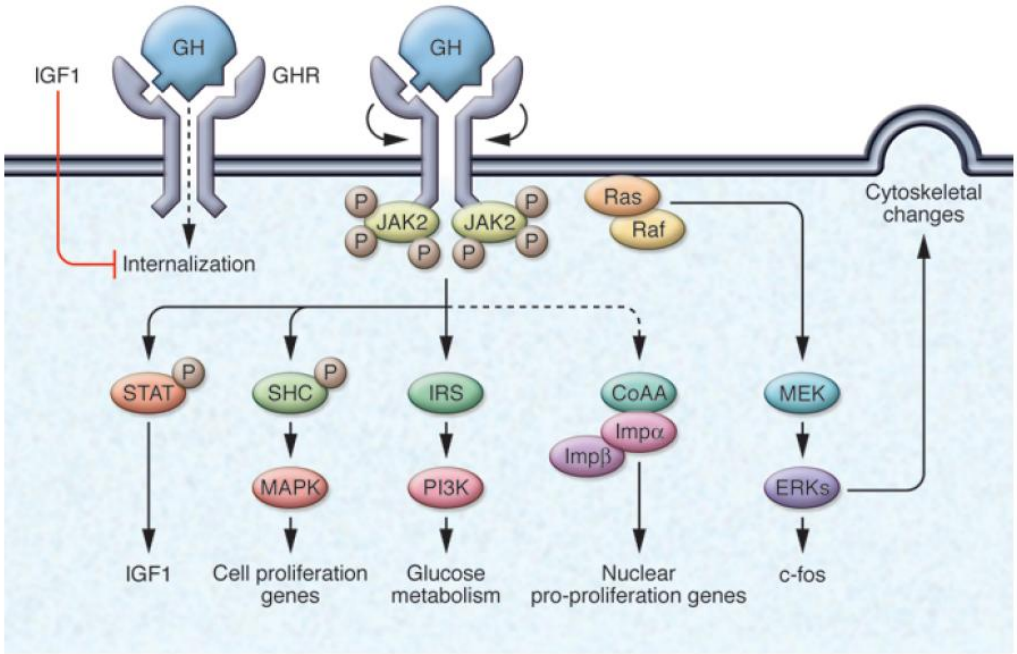

Figure 18 : Représentation des voies de signalisations activées par la GH. La torsion du GHR active les voies JAK/STAT, PI3K/AKT et Map-Kinase. Le GHR peut être internalisé et induire la transcription de gènes pro-prolifératifs (flèche en pointillé). L'IGF-1 peut inhiber l'internalisation du GHR. D'après Melmed, S. (Melmed, S., 2009).

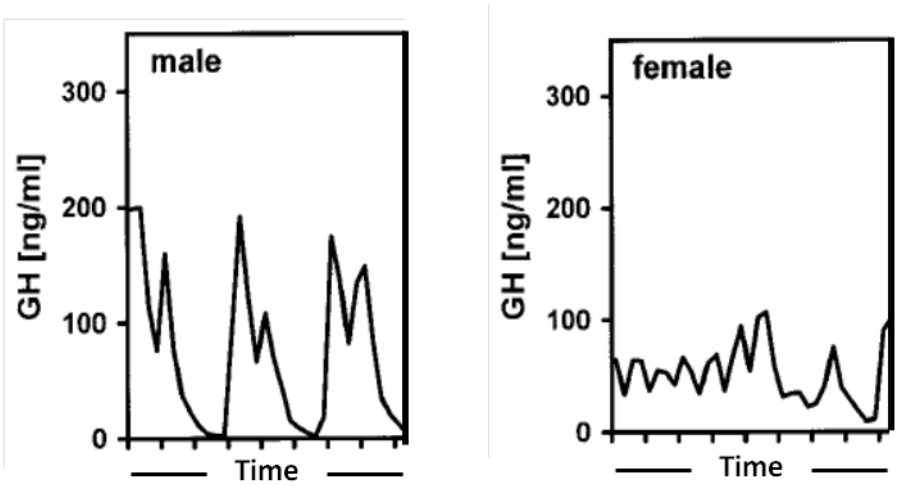

Figure 19 : Représentation de la pulsatilité de l'hormone de croissance (GH) chez le rongeur. La pulsatilité de GH est différente pour les mâles (graphique de gauche) et les femelles (graphique de droite). Les mâles présentent des pics de hautes amplitudes à intervalles réguliers tandis que les femelles ont des pics stochastiques de plus faibles amplitudes, avec un niveau basal élevé. Adapté de (Farhy, L. S. *et al.*, 2002).

GH que le GHR, ce qui favorise l'interaction de la GH avec son récepteur (Rosenbloom, A. L., 2007). L'action de la GH se fait par sa fixation à son récepteur, le GHR. La GH active les voies de signalisation JAK/STAT (*Janus Kinases/ Signal Transducers and Activators of Transcription*), PI3K/AKT et MAPK **(Figure 18)** (Melmed, S., 2009). La GH se fixe à son récepteur sous forme de dimère ce qui engendre une légère torsion interne de GHR permettant la phosphorylation de JAK2 et ainsi l'activation de différents signaux de transduction dont la phosphorylation de STAT5b. Les cibles des voies de signalisation sont l'IGF-1, c-fos (facteur de transcription), des gènes de prolifération cellulaire, du métabolisme du glucose et des protéines du cytosquelette. On peut également avoir une internalisation du récepteur ce qui induit la transcription de gènes pro-prolifératifs (Melmed, S., 2009).

De manière importante, il existe un dimorphisme sexuel de la pulsatilité de GH, avec chez les mâles une sécrétion avec des pics de hautes amplitudes à intervalles réguliers séparés par de faibles concentrations de GH, tandis que les femelles présentent des pics plus fréquents non réguliers de moindre amplitudes avec une concentration basale de GH élevée **(Figure 19)** (Farhy, L. S. *et al.*, 2002; Holt, R. I., 2002; Jaffe, C. A. *et al.*, 1998). Le dimorphisme sexuel de la sécrétion pulsatile de GH se fait en partie en période néonatale. En effet, il a été observé qu'une castration néonatale chez le rat engendrait une féminisation de la pulsatilité de l'hormone de croissance à l'âge adulte et inversement, une injection de testostérone à la naissance chez les femelles masculinise la pulsatilité de la GH (Chowen, J. A. *et al.*, 2004). Dans ce sens, à la naissance, le pic de testostérone permet d'influencer le nombre de neurones à GHRH présents à l'âge adulte et permet également de programmer leurs réponses aux stéroïdes sexuels, au cours de la puberté. De plus, les stéroïdes sexuels ont également une action primordiale au cours de la puberté sur la sécrétion de GH. Ces stéroïdes agissent par une régulation au niveau de l'hypothalamus des neurones à GHRH et SRIH (Chowen, J. A. *et al.*, 2004). En outre, un effet direct des stéroïdes sexuels sur les cellules somatotropes est également envisageable avec la présence de récepteurs aux œstrogènes sur les cellules GH (Chowen, J. A. *et al.*, 2004). Ces actions des stéroïdes sexuels au niveau hypophysaire impactent notamment le réseau de cellules somatotropes (Mollard, P. *et al.*, 2012).

La pulsatilité de la GH est directement régulée par les sécrétions de GHRH et de SRIH (Farhy, L. S. *et al.*, 2002). La sécrétion pulsatile de la GH implique une régulation très fine : en effet, en plus des régulations par le GHRH et le SRIH, la GH est également soumise à une régulation par des régulateurs périphériques et certains neuromédiateurs, mais aussi par la glycémie, le stress, le sommeil et certains acides aminés (Giustina, A. *et al.*, 1998; Melmed, S., 2009). L'horloge circadienne permet également de réguler la pulsatilité de GH (Bur, I. M. *et al.*, 2009). Le noyau suprachiasmatique permet ainsi de synchroniser la sécrétion de GH avec la lumière, qui présente un rythme nycthéméral, par l'intermédiaire entre autres des neurones SRIH (Davies, J. S. *et al.*, 2004).

Parmi les régulateurs potentiels, la régulation de la GH est étroitement associée au statut nutritionnel. Ainsi, on distingue notamment la ghréline, hormone stomacale orexigène, fortement régulée par la nutrition et découverte comme le ligand endogène du récepteur des GH sécrétagogues (GHS-R, *growth hormone secretagogue receptor*) (Hassouna, R. *et al.*, 2012). La ghréline, sous sa forme active octanoylée, permet entre autres de stimuler la sécrétion de GHRH, d'inhiber celle de somatostatine et de simuler directement la sécrétion de GH. D'autres hormones nutritionnelles comme la leptine et l'insuline permettent également de stimuler la sécrétion de GH (Watanobe, H. *et al.*, 2002; Steyn, F. J. *et al.*, 2016). En outre, l'insuline permet également la synthèse d'IGF-1 et est donc indispensable au fonctionnement de la GH. Cependant, il est à noter que le neuropeptide Y orexygènique, exprimé par les neurones à NPY du noyau arqué, peut stimuler la sécrétion de somatostatine et ainsi inhiber la sécrétion de GH (Sainsbury, A. *et al.*, 2001). Et de même, l'α-MSH anorexigènique, sécrété par les neurones à POMC du noyau arqué, inhibe la sécrétion de somatostatine et stimule ainsi celle de la GH (Steyn, F. J. *et al.*, 2016).

D'un point de vue développemental, les neurones à GHRH impliqués dans l'axe somatotrope, qui régule la croissance, sont situés dans le noyau arqué de l'hypothalamus, et apparaissent à partir du 16ème jour embryonnaire ($E_{16.5}$) chez le rat. Durant le développement, le GHRH induit la synthèse de PIT1 dans les progéniteurs des cellules somatotropes, ce qui stimule leur prolifération et leur différenciation (Gonzalez-Parra, S. *et al.*, 1996). Ainsi, une altération du développement des neurones à GHRH peut résulter en une altération subséquente du développement des cellules somatotropes (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Waite, E. *et al.*, 2010). Certaines données suggèrent néanmoins que l'ablation des neurones GHRH

induirait également une altération de la mise en place des cellules lactotrope (PRL+) hypophysaires (Le Tissier, P. R. *et al.*, 2005). La GH contrôle la sécrétion d'IGF-1 à partir de 20 jours de vie chez la souris par l'intermédiaire de son récepteur GHR, dont l'expression hépatique augmente fortement à partir de cet âge (Gluckman, P. D. et al., 1992).

Fonctions

La GH est connue pour son rôle sur la croissance et le métabolisme. Concernant la croissance, la faible concentration en GHR en période fœtale soutient l'absence d'implication de la GH au cours de cette période ou une action très limitée (Gluckman, P. D. *et al.*, 1992). Cette idée a été confortée avec les modèles expérimentaux. En ce sens, l'inactivation de la GH chez les souris *Snell dwarf* (dw) mutées pour le gène codant Pit-1 n'induit pas d'altération prénatale. De manière similaire, les souris *Little dwarf* (lit) présentant une inactivation du récepteur GHRH n'ont pas d'altération de la croissance prénatale. Cependant, à l'âge adulte, les souris Snell dwarf ont un poids inférieur de 70% à celui des Wild-Type, tandis que les Little dwarf ont un poids diminué de 50%. Dans le même sens, le syndrome de Laron chez l'Homme associé à une résistance à la GH n'est pas associé à un retard de croissance intra-utérin mais à un retard de croissance postnatale. Ces données dans leur ensemble suggèrent que la GH joue principalement un rôle fondamental dans la croissance somatique postnatale (Baker, J. *et al.*, 1993). Chez la souris, ce rôle apparait aux alentours de 20 jours de vie, avec la forte augmentation de l'expression du GHR au niveau du foie. Cette action est principalement médiée par l'IGF-I. Bien que la majorité des effets de la GH soit relayée par l'IGF-1, la GH exerce aussi des actions *per se,* notamment sur la croissance du cartilage au niveau des chondrocytes et sur les os au niveau des ostéoblastes.

La GH a également un rôle important dans la prolifération et la différenciation de nombreux tissus comme les muscles squelettiques, le rein, le cœur, *etc*. La GH présente également un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique sur divers tissus (tissu adipeux et muscles) (Vijayakumar, A. *et al.*, 2011). La GH stimule la lipolyse et favorise donc l'hydrolyse des triglycérides notamment au niveau du tissu adipeux et réduit donc la masse grasse. Au niveau musculaire, la GH stimule également l'anabolisme protéique. Elle présente également un rôle hyperglycémiant. Concernant ce dernier point, il existe un lien important

avec la ghréline. En effet, la ghréline est sécrétée par l'estomac avant les repas et dans le cas de dénutrition chronique. Son injection a été associée à une augmentation de la GH circulante, une hyperglycémie et une baisse des taux d'insuline circulante. Ces effets, pourraient être en partie engendrés par la GH directement. Néanmoins, l'utilisation d'agonistes moins puissants (hexareline) suggère également un rôle direct de la ghréline sur ces facteurs (Broglio, F. *et al.*, 2001). Ceci pourrait suggérer une action coordonnée de la GH et de ses sécrétagogues sur le métabolisme. De manière importante, ces données dans leur ensemble indiquent que toute altération de la sécrétion de GH peut engendrer des altérations non seulement de la croissance mais également métaboliques.

β. L'axe thyréotrope

Les neurones thyréotropes localisés dans le noyau paraventriculaire (PVN) projettent au niveau de l'éminence médiane et sécrètent la TRH (*thyrotropin releasing hormone*). La TRH stimule la synthèse et la sécrétion de thyréostimuline (TSH) par les cellules thyréotropes de l'adénohypophyse **(Figure 15)**. La thyréostimuline permet ensuite la synthèse des hormones thyroïdiennes (TH) au niveau de la thyroïde. On distingue la thyroxine (T4) contenant quatre atomes d'iode et la triiodothyroxine (T3) contenant trois atomes d'iode. La T4 est une forme précurseur qui est convertie en T3 et active des facteurs de transcription (Hoermann, R. *et al.*, 2015).

L'axe thyréotrope est impliqué dans la thermorégulation ainsi que dans le métabolisme énergétique. La T3 stimule la glycogénolyse, la lipolyse et dans une moindre mesure la protéolyse. De plus, les THs peuvent également stimuler la chaîne respiratoire mitochondriale et induire la production de chaleur. Les THs participent également à la croissance et au développement de l'organisme. Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle direct sur la croissance osseuse mais sont également nécessaires à l'action optimale de l'hormone de croissance ainsi que celle de l'IGF-1 (Zimmermann, M. B. *et al.*, 2007). Les hypothyroïdies ont notamment été associées à une altération des taux circulants en IGF-1, IGFBP-3 et IGFBP-1 (Iglesias, P. *et al.*, 2001).Au cours du développement fœtal, les hormones thyroïdiennes sont essentielles à la croissance et au développement correct du fœtus (Iglesias, P. *et al.*, 2001). Les déficiences en iode au cours de la gestation sont ainsi associées

à des retards de croissance ainsi qu'à des déficits neurologiques (Alvarez-Pedrerol, M. *et al.*, 2009; Zimmermann, M. B., 2012).

γ. L'axe gonadotrope

Les neurones à gonadotrophine (GnRH, *gonadotropin releasing hormone*), localisés dans l'aire préoptique, stimulent la sécrétion des hormones luteïnisantes (LH, *luteineizing hormone*) et folliculo-stimulantes (FSH, *follicle stimulating hormone*) par les cellules gonadotropes antéhypophysaires **(Figure 15)**. La LH et la FSH ont ensuite une action sur les gonades pour permettre la sécrétion des stéroïdes sexuels. On distingue également au niveau de l'hypothalamus la présence de neurones à kisspeptine dans le noyau antéro-ventral périventriculaire (AVPV) et dans le noyau arqué (ARC). Ces neurones permettent de réguler respectivement la production de GnRH, au niveau leur corps cellulaire dans le POA, ou la sécrétion au niveau de leur terminaison axonale dans l'éminence médiane. Les stéroïdes sexuels forment une boucle de rétrocontrôle sur les neurones kisspeptinergiques, activatrice ou inhibitrice, ce qui permet aux gonades de réguler l'expression de GnRH (d'Anglemont de Tassigny, X. *et al.*, 2010).

L'axe gonadotrope intervient dans le déclenchement de la puberté et la régulation de la reproduction (d'Anglemont de Tassigny, X. *et al.*, 2010; Caron, E. *et al.*, 2012). Cet axe est essentiel pour la maturation des organes sexuels et pour la gamétogenèse (spermatogénèse chez le mâle et oogenèse chez la femelle) (d'Anglemont de Tassigny, X. et al., 2010). L'axe gonadotrope est également important pour la croissance. En effet, au cours de la puberté, les stéroïdes stimulent la croissance par une action directe sur les chondrocytes mais également en stimulant la synthèse de GH et donc d'IGF-1. Ainsi, lors de la puberté, on observe une forte relation entre la taille, la concentration en IGF-1 et celle de testostérone ou d'œstradiol (Cole, T. J. et al., 2015).

δ. L'axe corticotrope

Les neurones corticotropes localisés dans le PVN synthétisent la corticolibérine (*CRH, corticotropin releasing hormone*). La CRH stimule la production d'ACTH (*adreno corticotropin hormone*) par les cellules corticotropes de l'adénophypophyse **(Figure 15)**. L'ACTH induit la sécrétion de corticostéroïdes par les surrénales, dont les glucocorticoïdes. L'axe corticotrope régule le comportement (anxiété, agressivité, *etc.*), la réponse au stress, la mémoire et l'apprentissage, le développement et la maturation des organes. Ils présentent également un important rôle métabolique : ils stimulent la gluconéogenèse, le catabolisme protéique et la lipolyse (Caldji, C. *et al.*, 1998; Kubzansky, L. D. *et al.*, 2010). Les glucocorticoïdes ont également un rôle anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Il est à noter que les glucocorticoïdes inhibent la croissance en inhibant le GHRH et donc la sécrétion de GH (Mazziotti, G. *et al.*, 2013).

ε. L'axe lactotrope

Les neurones dopaminergiques (DA) synthétisent la dopamine. Ils sont localisés dans le noyau arqué de l'hypothalamus et inhibent en continue la sécrétion de prolactine par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse **(Figure 15)** (Nunez, L. *et al.*, 2003; Musumeci, G. *et al.*, 2015). Plusieurs études ont démontré la co-expression de GHRH et de dopamine dans certains neurones du noyau arqué (Phelps, C. J. *et al.*, 2003). Ces neurones semblent sécréter indépendamment le GHRH ou la dopamine en fonction des besoins. L'axe lactotrope est principalement important pour la reproduction (Davies, J. S. *et al.*, 2004; Sonigo, C. *et al.*, 2012; Grattan, D. R., 2015; Triebel, J. *et al.*, 2015). La prolactine est également nécessaire à la lactogenèse maternelle (Romano, N. *et al.*, 2013).

2. Fonctions neuro-neuronales de l'hypothalamus

L'hypothalamus est un centre intégrateur recevant des afférences neuronales multiples. Outre la régulation des grandes fonctions par régulations endocriniennes, il a également une action par voie nerveuse *via* le système végétatif. Il régule ainsi la coordination du rythme circadien, la thermorégulation ou encore la prise alimentaire et le métabolisme.

Le cycle circadien permet la synchronisation de l'organisme avec l'environnement à la fois pour la fonction biologique et comportementale (Bonnefont, X., 2010; Orozco-Solis, R. *et al.*, 2016). L'horloge circadienne hypothalamique coordonne l'ensemble des horloges internes des divers tissus. L'horloge circadiennne implique les noyaux suprachiasmatiques (SCh). Ces noyaux reçoivent des afférences des nerfs optiques qui transmettent les informations sur la luminosité ambiante et permettent ainsi un maintien de la synchronisation avec l'environnement extérieur. Le fonctionnement de toutes horloges biologiques fait intervenir les facteurs de transcription CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) ainsi que le système CRY/PER (*cryptochrome*/*period*).

La thermorégulation est contrôlée à la fois par une voie nerveuse et par une voie endocrinienne. La voie endocrinienne régule la dépense de chaleur par l'intermédiaire de l'axe thyréotrope qui joue un rôle dans le métabolisme énergétique. La voie nerveuse implique les noyaux postérieurs et les noyaux antérieurs de l'hypothalamus. Ces noyaux reçoivent des informations afférentes des récepteurs thermiques de la peau et des viscères (Benarroch, E. E., 2007). Les noyaux postérieurs stimulent l'augmentation de la température corporelle tandis que les noyaux antérieurs favorisent la dépense de chaleur. Cette première se fait au niveau des tissus adipeux bruns et beiges.

La prise alimentaire et le métabolisme sont régulés par divers noyaux de l'hypothalamus. L'intégration des niveaux circulants reflétant l'état nutritionnel de l'organisme de façon directe (glycémie, acides aminés) et/ou indirecte *via* la leptine, l'insuline et la ghréline est réalisée par les neurones à NPY/AgRP (*Neuropeptide Y/Agouti-Related Protein*) à rôle orexigène, et les neurones à POMC/CART (*Pro-opiomelanocortine /Cocaine and Amphetamine Related Transcript*) à rôle anorexigène. Ces neurones qui jouent le rôle de senseurs de l'état nutritionnel de l'individu et de satiété sont localisés dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Les neurones à NPY et POMC projettent tous deux dans le noyau paraventriculaire et dorsomédian (PVN, DMH) ainsi que dans l'aire latérale hypothalamique (LHA) (Bouret, S. G. *et al.*, 2006). Le NPY active ses propres récepteurs Y1r et Y2r (*neuropeptide Y receptor*). Les neurones à POMC sécrètent l'αMSH (*α melanocyte stimulating hormone*), qui dérive du précurseur protéique POMC, et active les récepteurs MC3-R et MC4-R (*melanocortin receptor*). La liaison de l'αMSH à ses récepteurs est

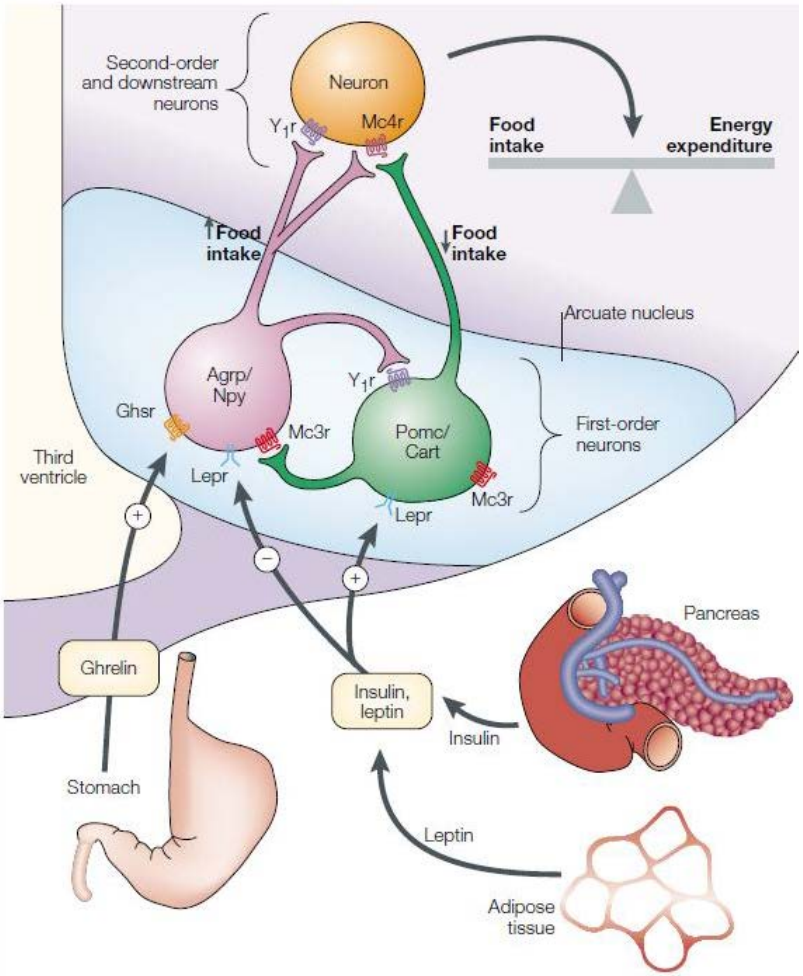

Figure 20 : Contrôle de l'homéostasie énergétique *via* les neurones à NPY/AgRP et les neurones à POMC/CART. Ces neurones sont respectivement à rôle orexigènes et anorexigènes. Ils sont régulés entre autres par les hormones circulantes. L'insuline et la leptine inhibent les neurones à NPY/AgRP et plus tardivement activent les neurones à POMC/CART. La ghréline peut quant à elle activer les neurones à NPY/AgRP. Il existe une inhibition réciproque entre ces deux populations, et différentes efférences permettant de contrôler la prise alimentaire et le métabolisme énergétique. Abréviations : Ghsr, récepteur de la ghréline ; Lepr, récepteur de la leptine ; Mc3r/Mc4r, récepteurs mélanocortine 3/4 ; Y_1r, récepteur du neuropeptide Y. D'après Barsh, S. G. *et al.* (Barsh, G. S. *et al.*, 2002).

directement antagonisée par l'AgRP. De plus, les neurones à NPY/AgRP et POMC/CART peuvent directement s'autoréguler entres eux.

La ghréline sécrétée par l'estomac stimule les neurones à NPY et donc la prise alimentaire, tandis que l'insuline et la leptine stimulent les neurones à POMC et limitent la prise alimentaire **(Figure 20)** (Cowley, M. A. *et al.*, 2001; Barsh, G. S. *et al.*, 2002). La leptine permet une régulation sur le long terme de la prise alimentaire tandis que la glycémie, l'insuline et la ghréline auront un effet à court terme.

En parallèle, les centres hypothalamiques régulant la prise alimentaire reçoivent également des signaux de l'estomac et du tractus digestif *via* le système végétatif. En outre, en plus de la régulation selon l'état nutritionnel, il existe un contrôle hédonique de la prise alimentaire, qui est également à prendre en considération. En effet, le plaisir apporté par la saveur d'un aliment serait suffisant à induire une prise alimentaire même en état de satiété. Les souris avec une ablation des neurones à NPY/AgRP réalisée à l'âge adulte présentent une diminution drastique de la prise alimentaire dans le cas d'une re-nutrition après un jeûne avec nourriture standard (Denis, R. G. *et al.*, 2015). En revanche, la prise alimentaire est inchangée par rapport aux souris contrôles si cela est réalisé avec une nourriture grasse et sucrée. Ces résultats suggèrent que la palatabilité de l'alimentation pourrait réguler une prise alimentaire indépendamment des neurones à AgRP, probablement *via* les neurones à dopamine situés dans l'aire tegmentale ventrale située dans le mésencéphale.

Pour résumer, le complexe hypothalamo-hypophysaire régule les grandes fonctions de l'organisme. Toute altération de son fonctionnement peut induire des effets délétères notables sur la régulation de ses fonctions, et donc sur l'émergence des pathologies. De même, tout défaut de mise en place du complexe hypothalamo-hypophysaire au cours du développement, qu'il soit anatomique et/ou fonctionnel, pourrait avoir un impact sur le fonctionnement des axes et sur l'émergence des pathologies adultes. En accord avec le concept du DOHAD (*developmental origins of health and disease)*, les travaux du laboratoire ont notamment mis en évidence une émergence plus importante des pathologies à l'âge adulte, suite à une altération de l'alimentation postnatale précoce dans un modèle murin (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Ceci a pu être associé à une altération du développement et de l'activité à l'âge adulte

de l'axe somatotrope, *via* la signalisation IGF-1, bien connue pour être sensible à la nutrition. En effet, l'axe somatotrope, qui régule le métabolisme adulte et la croissance staturo-pondérale pourrait refléter la réponse prédictive adaptative à la nutrition périnatale.

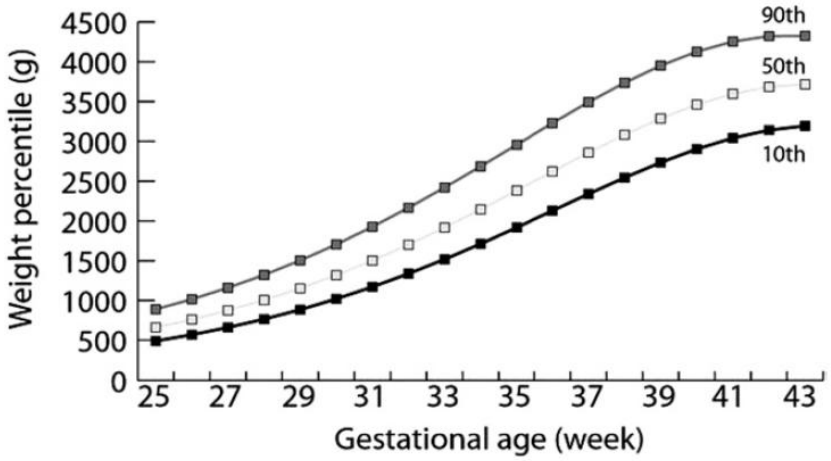

Figure 21 : Représentation des poids fœtaux (g) et des percentiles pour l'âge gestationnel chez l'Homme. Le 50ème percentile (50th) représente le poids moyen de la population pour l'âge gestationnel. D'après Platz, E. *et al.* (Platz, E. *et al.*, 2008).

III. Impact d'une dénutrition périnatale

A. Impact d'une dénutrition périnatale sur la croissance

En période *in utero* et au cours des premières semaines de vie chez la souris, la croissance est majoritairement contrôlée par le système IGF, indépendamment de l'hormone de croissance (Powell-Braxton, L. *et al.*, 1993). Au cours de cette période, l'IGF-1 est fortement contrôlé par la nutrition et notamment l'apport protéique (Fontana, L. *et al.*, 2008). En ce sens, il a été montré qu'un défaut des apports nutritionnels au fœtus au cours de la gestation pouvait induire un retard de croissance intra-utérin (RCIU). De même, la restriction protéique induit également un RCIU. Ceci a notamment été associé avec une diminution des taux circulants en IGF-1 (Setia, S. *et al.*, 2009) et une augmentation de l'IGFBP-1 dans le cas d'une diminution de l'apport nutritionnel et de l'insulinémie (Donahue, S. P. *et al.*, 1989; Fall, C. H. *et al.*, 1995; Holt, R. I., 2002; Lewitt, M. S. *et al.*, 2014).

Il est important de noter que la chronologie de maturation des organes est différente entres les Hommes et le modèle murin. En effet, le modèle murin est immature à la naissance et les organes continuent de se développer en période postnatale précoce. Ainsi la lactation chez la souris s'apparente plus à l'environnement en fin de gestation chez l'homme pour de nombreux systèmes.

On considère que 62% du poids de naissance résulte de l'environnement intra-utérin, contre 20% et 18% pour les gènes maternels et paternels respectivement (Holt, R. I., 2002). Chez l'Homme, le RCIU touche 3 à 7% des naissances dans les pays développés et se caractérise par une cassure de la courbe de croissance *in utero* et un fœtus petit pour l'âge gestationnel (*SGA, small for gestational age*) (Pladys, P., Labarthe, C., 2003). L'hypotrophie est définie en France par une biométrie à l'échographie inférieure au 10ème percentile **(Figure 21)**, une cassure de la courbe de croissance, un poids de naissance inférieur à 2,5kg et/ou une taille à la naissance inférieure à 2 déviations standards (2DS) (Platz, E. *et al.*, 2008; Rosenberg, A., 2008).

On distingue deux types d'hypotrophie. L'hypotrophie asymétrique qui se caractérise par un périmètre crânien plus important par rapport au poids corporel, ce qui indique une croissance cérébrale relativement conservée par rapport au reste du corps. Elle résulte le plus souvent d'une pathologie vasculaire intervenue au 3ème trimestre de grossesse ou d'une altération de l'apport nutritionnel au cours d'une période définie. L'hypotrophie symétrique est quant à elle caractérisée par une diminution homogène de la biométrie. Elle résulte généralement d'une altération de l'apport alimentaire intervenant dès le début de la grossesse (Pladys, P., Labarthe, C., 2003; Rosenberg, A., 2008).

Les causes du RCIU peuvent être d'origine maternelle, fœtale ou environnementale avec une composante génétique, vasculaire, ou nutritionnelle. Les causes de RCIU sont variables, avec pour 45% des cas une diminution des échanges fœtaux maternels. Ceci induit une diminution de l'apport maternel au fœtus en nutriment et/ou en oxygène. Une diminution des échanges est observée au cours de famine, de la prise de tabac, stress, alcool, drogue, ou d'une vascularisation altérée au niveau du placenta. Vingt-cinq pourcents des cas sont engendrés par des anomalies au niveau fœtal (Campus National de Gynécologie Obstétrique, C. N. G. O. F., 2006). Cependant, pour 30% des cas l'origine reste inconnue (Leger, J.).

Les complications à court terme peuvent être graves pour le fœtus. En effet, le RCIU augmente les risques de mort fœtale et néonatale. Pour cette dernière période, on observe une augmentation du risque d'asphyxie périnatale, d'hypertension et d'hémorragie pulmonaire, d'hypothermie et d'altération de la glycémie à la naissance (McIntire, D. D. *et al.*, 1999; Froen, J. F. *et al.*, 2004; Rosenberg, A., 2008). Suite à un diagnostic de RCIU, si le maintien de la grossesse ne permet plus d'améliorer la survie fœtale, le déclenchement de l'accouchement ou une césarienne peut être réalisée. Si l'accouchement est réalisé avant 32 semaines de gestations un traitement par glucocorticoïdes peut être administré afin d'assurer la maturation des poumons du nouveau-né. A la naissance, un apport nutritionnel important est administré afin d'assurer un maintien de la vitesse de croissance fœtale optimal, avec un retour à une taille normale et un bon développement cérébral.

Durant les premières années de vie, 90% des enfants nés avec un RCIU présentent un rattrapage de leur croissance. Seul 10% des enfants nés avec un RCIU présentent un défaut de croissance qui persiste à l'âge adulte (Leger, J.). Les mécanismes permettant ce rattrapage de croissance ne sont pas connus. En revanche, il a été observé qu'un rattrapage précoce de la croissance était associé à une susceptibilité accrue de développer des pathologies de type cardio-métabolique à l'âge adulte (Levy-Marchal, C. *et al.*, 2004; McMillen, I. C. *et al.*, 2005; Beltrand, J. *et al.*, 2008).

Le laboratoire a précédemment montré qu'une altération transitoire de la nutrition chez la souris au cours de la lactation était associée à une altération de la croissance, impliquant une altération de la mise en place de l'axe somatotrope, et de la susceptibilité aux pathologies ultérieures. Ces souris présentent à l'âge adulte une altération de l'expression du GHRH hypothalamique, des contenus hypophysaires de GH associés à une hypoplasie hypophysaire en cellule somatotrope, et à une diminution de l'IGF-1 plasmatique. Cependant, l'ontogenèse des neurones hypothalamiques et des progéniteurs hypophysaires débute durant la période fœtale (Caqueret, A. *et al.*, 2006). Aussi, il est également possible qu'une altération de la signalisation IGF-1 durant la période de développement fœtal puisse également influencer la mise en place de l'axe somatotrope et programmer son activité ultérieure et la croissance de l'organisme.

B. Impact d'une dénutrition en période périnatale sur l'émergence des pathologies (DOHAD)

D'autre part, plusieurs études chez l'Homme ont permis de lier le petit poids de naissance et le RCIU avec le développement des pathologies cardio-métaboliques ou encore des altérations neurologiques à l'âge adulte (Hales, C. N. *et al.*, 1992; Barker, D. J., 1995; Barker, D. J., 1998; Roseboom, T. J. *et al.*, 2001; Roseboom, T. *et al.*, 2006; Olivier, P. *et al.*, 2007; Murray, E. *et al.*, 2015). Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse d'une programmation fœtale de pathologies chroniques à l'âge adulte, ou hypothèse de Barker (Barker, D. J., 2007). Cette hypothèse a ensuite été affinée avec l'énoncé du concept de l'origine développementale de la santé et des pathologies adultes (DOHAD). Ce concept

sous-entend que, notamment en cas d'altération de l'environnement fœtal, le fœtus adapte son développement en prédiction de l'environnement que l'organisme prévoit d'affronter une fois né (Hattersley, A. T. *et al.*, 1999; Ozanne, S. E. *et al.*, 2002; Bateson, P. *et al.*, 2004). Les carences *in utero* induisent des troubles développementaux qui peuvent être adoucis ou exacerbés par des adaptations fonctionnelles. Aussi, on observe que, selon les fenêtres critiques du développement des organes, l'impact de la sous-nutrition est variable en fonction du moment de la gestation où les carences sont présentes (Roseboom, T. *et al.*, 2006). Cette diversité est probablement en partie associée aux fenêtres de susceptibilité des divers organes alors en développement. En effet, la restriction alimentaire peut induire des altérations directes de la mise en place de certains organes comme le rein par exemple (altération du nombre de glomérule chez les RCIU). Ceci peut amener une plus grande fragilité à développer des pathologies à l'âge adulte. De plus, la restriction alimentaire peut également altérer le fonctionnement des organes par des régulations d'expression géniques, et augmente également la susceptibilité aux pathologies. En cas de déviation entre la situation prédite *in utero* et la situation postnatale réelle, la fréquence des pathologies de type cardio-métabolique (obésité, diabète, hypertension artérielle, *etc.*) est accrue à l'âge adulte (Barker, D. J., 1995; Gluckman, P. D. *et al.*, 2004).

De manière importante, afin de diminuer les risques de mortalité précoce du nourrisson et de sous-développement cérébral, la majorité des nouveaux nés ont accès à un lait enrichi favorisant le rattrapage du poids théorique de naissance et leur croissance initiale (« *catch up growth* ») (Karlberg, J. P. *et al.*, 1997). Si 90% des RCIU rattrapent par la suite une croissance normale, il a été observé qu'un retour trop rapide à un poids dans les normes était associé à un risque plus important de développer une obésité précoce, avec une répartition des graisses altérée et un phénotype de syndrome métabolique plus sévère (Ong, K. K. *et al.*, 2000).

1. Pathologies cardio-métaboliques et syndrome métabolique

Chez les enfants nés avec un petit poids de naissance, le risque de développer ultérieurement un syndrome métabolique est nettement augmenté. Ce syndrome associe plusieurs composantes : l'obésité, l'hypertension artérielle, le diabète de type 2 et la.

dyslipidémie (Gluckman, P. D. *et al.*, 2004). En effet, on observe un risque dix fois plus élevé pour les personnes qui présentent un poids à la naissance inférieur à 2,5kg

Différentes études ont associé un faible poids à la naissance à un risque plus élevé d'hypertension artérielle (HTA) à l'âge adulte (Roseboom, T. J. *et al.*, 2001). Cette hypertension a été notamment associée à une augmentation de la résistance artérielle, à l'âge adulte, chez des enfants nés avec un RCIU (Roseboom, T. J. *et al.*, 2001; Vecchione, C. *et al.*, 2001; Vickers, M. H. *et al.*, 2001; Holt, R. I., 2002; Roseboom, T. *et al.*, 2006; Khorram, O. *et al.*, 2007). Les enfants nés avec un RCIU présentent une diminution du nombre de glomérules rénaux, ce qui favorise l'apparition à l'âge adulte d'une protéinurie pouvant évoluer en insuffisance rénale et une hypertension. De plus, une augmentation du risque d'infarctus du myocarde a également été observée chez les individus nés avec un RCIU (Barker, D. J., 1995; Menendez-Castro, C. *et al.*, 2011).

Concernant le métabolisme glucidique chez l'Homme, le faible poids de naissance a également été associé avec un risque accru de développer un diabète à l'âge adulte (Roseboom, T. *et al.*, 2006). Dans ce sens, les enfants nés avec un RCIU présentent une diminution du nombre de cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques et ainsi une diminution de la sécrétion insulinique (Gatford, K. L. *et al.*, 2013). Ceci pourrait s'expliquer par l'action fœtale des IGFs qui stimulent le développement des cellules β pancréatiques (Collett-Solberg, P. F. *et al.*, 2000; van Haeften, T. W. *et al.*, 2004). De plus, les protocoles de réalimentation postnatale et/ou les désordres de régulation de la prise alimentaire et du métabolisme pourraient également induire un risque accru de développer une obésité à l'âge adulte souvent associée à une résistance à l'insuline chez les enfants nés avec un RCIU (Ong, K. K. *et al.*, 2000; Gluckman, P. D. *et al.*, 2004).

Des résultats similaires ont été observés chez la souris, où une restriction au cours de la lactation engendre une intolérance au glucose insuline dépendante à l'âge adulte (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Ainsi, une dénutrition en période périnatale pourrait induire un diabète de type 2 insulinodépendant. De même, la restriction alimentaire au cours de la lactation chez la souris induit une HTA à 18 mois de vie. Ces souris présentent en effet une augmentation de la pression systolique et diastolique.

La dénutrition fœtale a également été associée à des désordres métaboliques et est corrélée chez le rat à une augmentation de l'expression de la FAS (*fatty acid synthase*), importante pour la lipogenèse, et de la PEPCK (*phospho enol pyruvate carboxy kinase*), importante pour la néoglycogenèse, au niveau hépatique (Gicquel, C. *et al.*, 2008). Ces altérations sont en accord avec le concept du DOHAD et l'hypothèse du PAR (réponse prédictive adaptative), qui suggèrent une adaptation du fœtus à un futur environnement nutritionnel limité.

De manière intéressante, des études publiées ces dernières années ont suggéré que cette susceptibilité à développer des pathologies de type cardio-métabolique suite à un RCIU pouvait être transmise dans une certaine mesure aux générations suivantes. En effet, les enfants issus de parents nés avec un RCIU présentent une augmentation de leur susceptibilité à développer une intolérance au glucose (Gluckman, P. D. *et al.*, 2004). De manière importante, il a été observé que cette susceptibilité pouvait être transmise en partie au moins sur trois générations chez le rat (Benyshek, D. C. *et al.*, 2006; Jimenez-Chillaron, J. C. *et al.*, 2009). Cet effet sur plusieurs générations pourrait impliquer des mécanismes épigénétiques (Desai, M. *et al.*, 2015).

2. Pathologies Neurologiques

De manière importante, le système nerveux central étant en fort développement durant la période fœtale, il est également très susceptible à l'environnement intra-utérin. Dans ce sens, on observe chez certains enfants nés avec un RCIU une altération du développement cortical, associée à une diminution du volume cérébral. Il a également été observé une hypotrophie de l'hippocampe, qui est impliqué dans la mémorisation et l'apprentissage (Cosmi, E. *et al.*, 2011). Ainsi, les enfants nés avec un RCIU présentent une augmentation de la susceptibilité à développer des atteintes sensorimotrices, sensorielles et intellectuelles, ainsi que des difficultés d'apprentissage. Ces enfants présentent notamment un plus grand risque d'infirmité motrice, de troubles de la coordination, de la manipulation, de l'attention, de comportement et d'hyperactivité. Il peut s'associer à ces différents symptômes, des troubles visuels et auditifs (Bale, T. L. *et al.*, 2010; Cosmi, E. *et al.*, 2011; Murray, E. *et al.*, 2015).

Suite à un RCIU, surtout si associé à une prématurité, les nouveaux nés sont nourris de façon importante afin de limiter les impacts neurologiques. Cette nutrition importante mise en place dès que possible permet d'assurer un meilleur développement cérébral au cours de la période postnatale. En effet, cette période sensible permet une compensation dans le développement et la plasticité cérébrale et diminue l'impact neurologique. L'inconvénient de cette approche est qu'en cas de trop forte alimentation, ceci se fait au détriment de la susceptibilité aux pathologies cardio-métaboliques ultérieures (Ong, K. K. *et al.*, 2000). A l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de données claires concernant les soins permettant d'allier un développement cérébral et un fonctionnement des systèmes cardio-métaboliques optimaux chez les enfants nés avec un RCIU.

C. Effet de la nutrition périnatale sur l'hypothalamus

L'hypothalamus régule les grandes fonctions de l'organisme et est donc particulièrement d'intérêt dans la programmation de la trajectoire de vie. En ce sens, plusieurs études démontrent les effets de la nutrition périnatale sur le développement de l'hypothalamus (Kappeler, L. *et al.*, 2009; Bouret, S. G., 2010; Cottrell, E. C. *et al.*, 2011). Ces études ont notamment suggéré qu'une altération de la nutrition périnatale pouvait altérer la programmation de la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme et de l'axe somatotrope. Ainsi, la nutrition au cours de la lactation est essentielle à la programmation de l'axe somatotrope. En effet, chez la souris, le changement de la taille des litières de 6 à 10 petits par mère est suffisant pour induire une restriction alimentaire durant la période de lactation (P1-P16) (Fiorotto, M. L. *et al.*, 1991). Le développement de l'axe somatotrope est alors retardé, et est associé à une expression plus faible du GHRH à 10 jours de vie (P10) (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Cette baisse d'expression lors de cette fenêtre de développement induit une hypoplasie hypophysaire permanente en cellules somatotropes et un contenu hypophysaire en GH plus faible dès P20. De plus, à partir de 40 jours, l'augmentation permanente du SRIH maintient l'activité de l'axe GH diminuée. Cette baisse est permanente et s'accompagne d'une baisse cohérente des taux circulants en IGF-1 et ALS chez l'adulte (Kappeler, L. *et al.*, 2009).

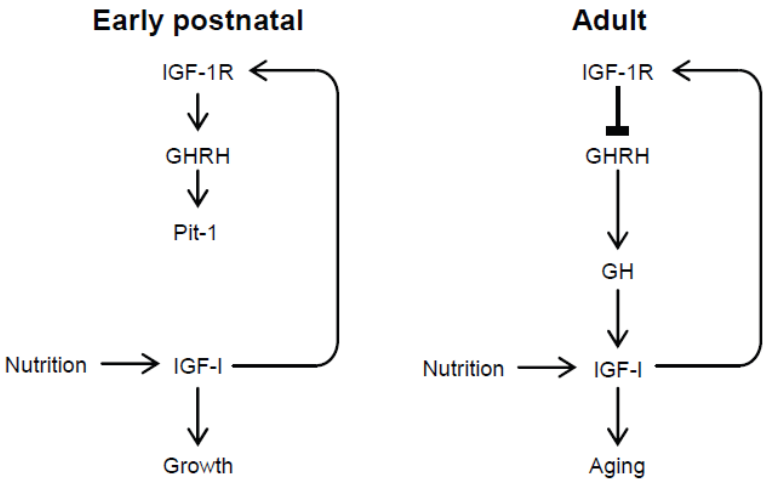

Figure 22 : Rôle de l'IGF-1 dans la programmation de l'axe somatotrope. En période postnatale, la signalisation IGF-1 précoce stimule le GHRH hypothalamique, ce qui induit la prolifération des progéniteurs des cellules somatotropes hypophysaires par la stimulation de Pit-1. A l'inverse, à l'âge adulte, l'GF-1 présente un rétrocontrôle négatif sur l'axe somatotrope. D'après Kappeler, L. *et al.* (Kappeler, L. *et al.*, 2008).

Cette programmation de l'axe somatotrope pourrait impliquer l'IGF-1, qui aurait une action positive au cours du développement, avant d'être impliquée dans la boucle de rétrocontrôle négatif de l'axe somatotrope **(Figure 22)**. En effet, l'étude du développement de cet axe dans le modèle de souris hétérozygotes pour l'IGF-1R spécifiquement dans le système nerveux central (SNC-*Igf-1r*$^{+/-}$) indique que la signalisation IGF dans le cerveau aurait un rôle essentiel. Ces souris SNC-*Igf-1r*$^{+/-}$ développent un retard de croissance postnatal avec une hypoplasie hypophysaire en cellules somatotropes, un contenu hypophysaire et une sécrétion de GH diminués (Xu, J. *et al.*, 2011), ainsi que des taux circulants en IGF-I, ALS et IGFBP3 plus faibles que les contrôles (Kappeler, L. *et al.*, 2008). Les mécanismes impliqués ne sont pour l'instant pas connus. Des études récentes du laboratoire chez les souris adultes préalablement restreintes montrent que la dénutrition durant la période de lactation induirait des modifications du statut épigénétique, notamment au niveau du promoteur du SRIH (Kappeler *et al.,* en préparation).

La programmation des neurones hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire semble aussi fortement régulée par la nutrition, et notamment par la leptine et l'insuline (Bouret, S. G. *et al.*, 2006; Vogt, M. C. *et al.*, 2014). En effet, différentes études ont permis de montrer le rôle de la leptine et de l'insuline en période périnatale sur l'innervation des neurones orexigène à NPY/AgRP, et des neurones anorexigène à POMC/CART. Ainsi, au cours de la lactation, une altération des taux de leptine induirait une diminution de l'innervation des neurones à NPY/AgRP et POMC/CART au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus (Bouret, S. G. *et al.*, 2006; Bouret, S. G. *et al.*, 2007; Bouret, S. G. *et al.*, 2008; Bouyer, K. *et al.*, 2013). Le pic de leptine en période postnatale précoce permettrait de stimuler la croissance axonale de ces neurones et serait donc essentielle à leur mise en place (Bouret, S. G. *et al.*, 2008). De manière similaire, une altération de l'insuline a également été associée avec un défaut d'innervation du PVN par les neurones régulant la prise alimentaire (Vogt, M. C. *et al.*, 2014). En outre, la ghréline, hormone stomacale orexigène régulée par la nutrition, a récemment été impliquée dans le développement du réseau de neurones hypothalamiques régulant la prise alimentaire. En effet, l'addition de ghréline sur des cultures d'explants de noyau arqué d'hypothalamus inhibe la croissance axonale des neurones de l'ARC. De plus, l'injection de ghréline chez les souriceaux entre P4 et P12 diminue la densité d'innervation du noyau paraventriculaire (PVN) par les neurones à NPY/AgRP et POMC/CART. Ces données suggèrent un potentiel rôle de

la ghréline dans la programmation hypothalamique des neurones régulant la prise alimentaire, et suggèrent un probable rôle sur la synaptogenèse. Ce rôle serait en accord avec la forte augmentation de la ghréline active (octanoylée) dans le sang des souriceaux en période postnatale tardive, à partir de P14-P16 (Collden, G. *et al.*, 2015; Steculorum, S. M. *et al.*, 2015).

Enfin, d'autres systèmes hypothalamiques pourraient être sensibles à la nutrition. En ce sens, un potentiel impact de la nutrition périnatale sur le fonctionnement de l'axe gonadotrope a également été suggéré. En effet, une restriction alimentaire induite par augmentation de la taille des portées chez la souris a été associée à des défauts d'innervations au niveau des neurones GnRH par les neurones kisspeptinergiques situés dans le noyau arqué (Caron, E. *et al.*, 2012).

En plus de l'alimentation, d'autres éléments de l'environnement périnatal semblent également avoir un rôle dans les mécanismes d'adaptations de l'organisme. En effet, des études chez le rat ont montré qu'un faible comportement maternel caractérisé par une diminution de la fréquence de toilettage des petits engendre une hyperactivité de l'axe corticotrope en réponse au stress. En effet, suite à un faible comportement maternel, les rats présentent à l'âge adulte une augmentation du CRH hypothalamique associée à une augmentation des concentrations plasmatiques en ACTH et en corticostérone par rapport à celles des contrôles en réponse à un stress (Liu, D. *et al.*, 1997; Caldji, C. *et al.*, 1998). Cette dérégulation est induite par une modification du rétrocontrôle hippocampique. Chez l'Homme, on observe également une augmentation du risque de développer des désordres neurologiques à l'âge adulte comme la dépression suite à des maltraitances au cours de l'enfance (Bale, T. L. *et al.*, 2010).

Ce concept de programmation périnatale fait écho à des programmations observées dans d'autres systèmes comme le système immunitaire. En effet, la relation hôte pathogène semble aussi en partie programmable, notamment dans le cas d'une primo-infection précoce. Ainsi, un mimétisme de primo-infection effectué avec une injection de LPS (lipopolysaccharide) entre P7 et P28 chez le rat programme une réponse atténuée aux

expositions ultérieures au LPS. Cette réponse atténuée serait induite par une augmentation de l'activité des cellules immunitaire TLR4, engendrant une augmentation de l'activité de l'axe corticotrope et donc de la synthèse de glucocorticoïdes à rôle anti-inflammatoire (Spencer, S. J. *et al.*, 2011).

Dans leur ensemble, ces différentes études mettent en évidence le principe de l'origine développementale de la santé et des pathologies à l'âge adulte (DOHAD) et de la programmation adaptatrice prédictive. Ces études indiquent que la nutrition en période périnatale (*in utero* et postnatale précoce) est essentielle à la programmation des divers axes contrôlés, notamment au niveau des neurones de l'hypothalamus. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux mécanismes impliqués dans le développement de l'axe somatotrope. Ce dernier étant un bon reflet des altérations de la trajectoire développementale en réponse à une modification de la nutrition. Les études précédentes du laboratoire suggèrent un impact de la nutrition sur le développement des neurones à GHRH, notamment *via* la signalisation IGF-I. La restriction alimentaire induit également une diminution des taux circulants de leptine et d'insuline. La suite de cette introduction présentera donc quelques données sur le développement neuronal notamment au niveau de l'hypothalamus, et l'implication de ces trois facteurs/hormones.

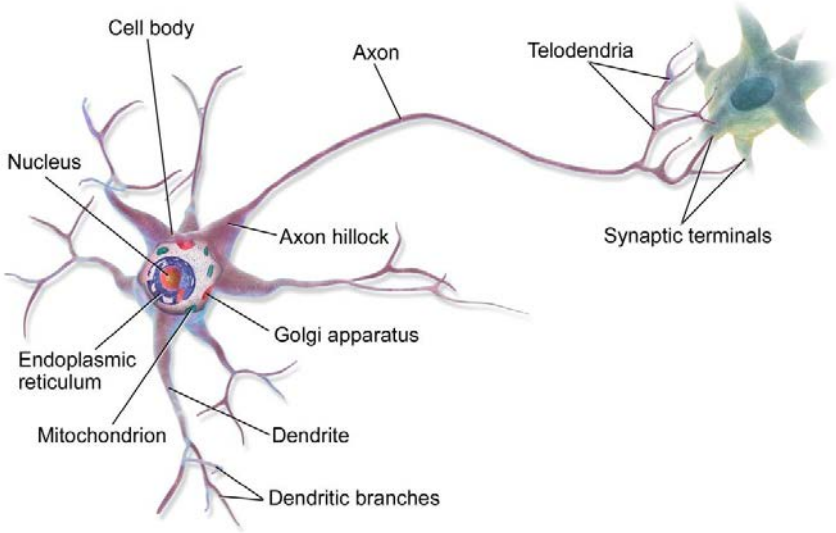

Figure 23 : Représentation schématique d'un neurone. On distingue le corps cellulaire et les prolongements neuronaux comme les dendrites et l'axone.

IV. Le développement neuronal

Le système nerveux est constitué de deux grands types de cellules : les neurones (10^{11} dans le cerveau humain) et les cellules gliales (10^{12} dans le cerveau humain).

Un neurone est une cellule excitable et polarisée capable de propager un courant. Un neurone est constitué d'une structure dite réceptrice contenant les dendrites et le corps cellulaire (aussi appelés péricaryons ou soma), d'une structure conductrice constituée de l'axone, et d'une structure sécrétrice au niveau des synapses **(Figure 23)**. La présence de canaux ioniques membranaires permet de générer les potentiels d'actions des neurones. La dépolarisation d'un neurone est engendrée par une entrée de sodium due aux canaux sodiques voltages dépendants, la repolarisation est quant à elle induite par une sortie d'ions potassiques engendrée par des canaux potassiques voltages dépendants. La majeure partie des axones est entourée d'une gaine de myéline discontinue, qui assure un rôle protecteur, isolant, et qui accroit la vitesse de transmission de l'influx nerveux.

Les cellules gliales ont quant à elles un rôle de protection et de maintien de l'homéostasie du système nerveux. On distingue différents types : Les astrocytes présents dans le système nerveux central (SNC), qui favorisent le contrôle local du milieu extracellulaire (Sofroniew, M. V. *et al.*, 2010). Les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (SNP) et les oligodendrocytes dans le SNC, qui sont responsables la myélinisation des axones. On distingue également la microglie qui possède un rôle essentiellement immunitaire (Waisman, A. *et al.*, 2015) et enfin les cellules épendymaires qui permettent la synthèse de liquide céphalo-rachidien.

A. Neurogenèse

Au cours du développement fœtal, une des principales étapes de la formation du système nerveux central est la neurogenèse. Elle désigne l'ensemble du processus de formation d'un neurone fonctionnel à partir d'une cellule souche neurale ou neuroblaste. Chez le rat, la neurogenèse débute à $E_{10,5}$ dans l'ensemble du neuroectoderme, et à $E_{8,5}$ chez la souris et se prolonge en période postnatale dans certaines structures du cerveau

(Markakis, E. A., 2002; Bouret, S. G., 2010). Ce processus ne se restreint pas à la période périnatale. En effet, le cerveau à l'âge adulte possède une certaine plasticité neuronale indispensable à l'apprentissage (Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). Environ 1% de l'expression des gènes impliqués dans la neurogenèse varie en fonction du sexe ou encore de la souche de la souris, ce qui peut expliquer les différences observées entre les mâles et les femelles et entre les différents fonds génétiques (Shimogori, T. *et al.*, 2010).

Le neurodéveloppement suit plusieurs étapes qui comprennent la prolifération et la différenciation des cellules souches en progéniteurs neuronaux, leur migration jusqu'à leur emplacement final, et enfin la différenciation terminale. Cette-dernière comprend la dendritogenèse, l'axogenèse et la synaptogenèse. Dans ce chapitre, nous développerons particulièrement l'action de l'IGF-1, mais aussi de la leptine et de l'insuline, trois hormones fortement régulées par la nutrition, sur ces différentes phases de développement.

1. Prolifération, différenciation et migration neuronale

Au cours de la période neurogénique ($E_{9,5}$-$E_{16,5}$ chez la souris), les cellules souches neurales produisent des précurseurs neuronaux qui vont ensuite se différencier et migrer jusqu'à leur position finale (MacKay, H. *et al.*, 2014). En période embryonnaire, antérieure à $E_{10.5}$ chez la souris, la région du diencéphale se sépare des autres régions grâce à l'influence de signaux organisationnels comme les Wnts (*Wingless/Integrin*) et le Shh (*Sonic hedgehog*) (Echelard, Y. *et al.*, 1993; Alvarez-Buylla, A. *et al.*, 2014; Blaess, S. *et al.*, 2014). La neurogenèse hypothalamique débute dès $E_{9.5}$ chez la souris (Pelling, M. *et al.*, 2011). Les neurones hypothalamiques sont issus des cellules progénitrices neuronales situées dans deux zones ventriculaires distinctes, la partie médiane et la partie ventrale du 3ème ventricule (Sousa-Ferreira, L. *et al.*, 2014). La neurogenèse de l'hypothalamus se fait selon une génération de type « *outside-in* » (Shimada, M. *et al.*, 1973; Caqueret, A. *et al.*, 2006). On distingue trois vagues de neurogenèse de l'hypothalamus : la première génère la zone latérale, la deuxième la zone intermédiaire et la troisième la zone médiane. Les autres sous-populations hypothalamiques sont générées en période embryonnaire tardive ($E_{16.5}$-$E_{18.5}$) incluant les cellules épendymaires et les cellules ciliées. Les tanycytes sont générés à partir de $E_{18.5}$ par une différenciation d'une sous-population de cellules gliales (Maggi, R. *et al.*, 2014).

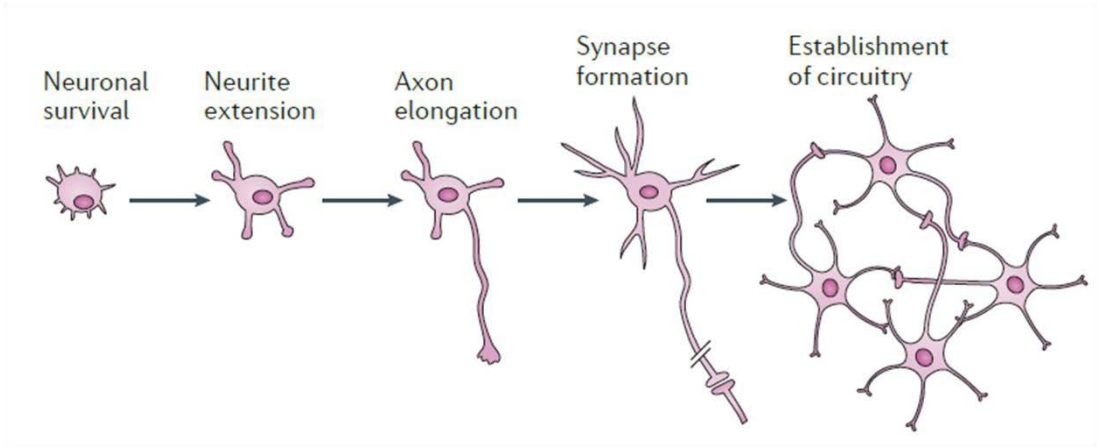

Figure 24 : Illustration d'une partie des grandes étapes du développement neuronal. Les progéniteurs neuronaux présentent une extension des neurites, suivie de l'élongation axonale et de la mise en place de synapses, ce qui conduit à l'établissement du circuit neuronal. D'après Fernandez, A. M. *et al.* (Fernandez, A. M. *et al.*, 2012).

Suite à la prolifération des cellules souches, les neuroblastes se différencient en progéniteurs neuronaux. On peut par la suite différencier les tissus neuronaux avec les neurones labélisés par TuJ1 (neuron-specific β tubulin) (Memberg, S. P. *et al.*, 1995), les astrocytes par GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) et les oligodendrocytes par le marqueur O4. Chez la souris, la majorité des neurones du cerveau devient post-mitotiques à $E_{12.5}$-$E_{14.5}$ avant de migrer jusqu'à leur destination finale. La migration fait intervenir des extensions cellulaires : les filopodes et les lamellipodes présents au niveau des neurites et composés d'actine. Ces projections permettent d'explorer le microenvironnement et d'induire le mouvement grâce à la polymérisation de l'actine. Par la suite, le centrosome situé en avant du noyau exerce une force de traction par l'intermédiaire des microtubules sur ce dernier, ce qui engendre la nucléokinèse (Luhmann, H. J. *et al.*, 2015).

Les neurones hypothalamiques migrent depuis la partie médiane et ventrale du 3ème ventricule afin de générer le noyau supraoptique (SON), le noyau paraventriculaire (PVN), le noyau périventriculaire (PeV) et le noyau arqué (ARC), *etc* (Maggi, R. *et al.*, 2014; Sousa-Ferreira, L. *et al.*, 2014). Les neurones GnRH sont quant à eux distincts puisqu'ils dérivent de cellules précurseurs neuronales du bulbe olfactif, et rejoignent le POA par une migration tangentielle.

La neurogenèse a également été reportée dans l'hypothalamus adulte avec des niches neurogéniques localisées dans la région ventro-latérale du 3ème ventricule. L'identification du type cellulaire responsable de cette neurogenèse est encore débattue (Maggi, R. *et al.*, 2014). Cependant, il a été montré chez la souris adulte que les tanycytes α2 peuvent proliférer et générer des neurones, des astrocytes et d'autres sous-populations de tanycytes en réponse au FGF (*fibroblast growth factor*) (Robins, S. C. *et al.*, 2013).

2. Développement de l'arborisation dendritique et croissance axonale

Lorsque le neurone est arrivé à destination, la migration neuronale est stoppée et le progéniteur finalise sa différenciation. La maturation neuronale comprend notamment l'extension des neurites, la polarisation de l'axone et son extension, puis la formation de synapses pour ainsi créer un réseau neuronal fonctionnel **(Figure 24)** (Fernandez, A. M. *et al.*, 2012).

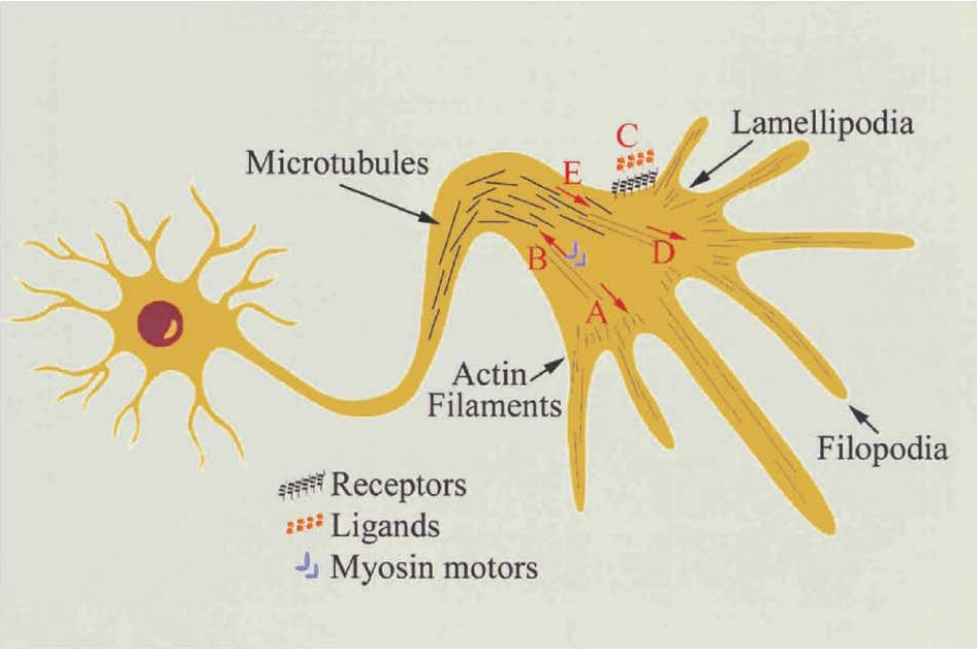

Figure 25 : Représentation schématique de la croissance axonale. A la périphérie du cône de croissance, les filaments d'actines polymérisent vers les extrémités (A) mais sont dépolymérisés au niveau central par la myosine (B). Celle-ci induit ainsi un flux rétrograde et bloque l'avancée des microtubules. Certains signaux peuvent supprimer ce flux rétrograde (C), et ainsi permettre la progression du cône de croissance (D) et la polymérisation des microtubules (E). D'après Goldberg, J. L. (Goldberg, J. L., 2003).

La polarisation de l'axone est une étape cruciale. Initialement, on distingue les neurites qui correspondent à des prolongements cytoplasmiques du corps cellulaire, et toutes les neurites ont le potentiel de devenir un axone. Au cours de leur croissance, l'une des neurites se développe plus que les autres et forme l'axone. Les autres neurites deviennent les dendrites (Ramon y Cayal, S., 1890; Bradke, F. *et al.*, 2000). Cette polarisation d'une neurite en axone semble notamment impliquer la famille des Rho GTPases mais également une isoforme particulière du récepteur aux IGFs, l'IGF-1$R_{\beta gc}$ (Bernis, M. E. *et al.*, 2013; Dupraz, S. *et al.*, 2013).

La croissance de l'axone implique une synthèse protéique somatique, mais également une synthèse protéique locale le long de l'axone, où l'on détecte du réticulum endoplasmique ainsi que des ribosomes (Goldberg, J. L., 2003). La croissance axonale fait intervenir la synthèse du cytosquelette du neurone, avec la présence de microtubules au niveau de l'axone jusqu'au début du cône de croissance, et la présence dans ce dernier de filaments d'actine. La croissance axonale a lieu majoritairement à l'extrémité de l'axone, au niveau du cône de croissance. La croissance axonale requiert la coordination de l'expression génique dans le soma, de la traduction locale de protéines dans l'axone, du transport antérograde nécessaire à la croissance axonale et de l'assemblage du cytosquelette et des membranes dans le cône de croissance (Liu, C. M. *et al.*, 2012). Dans le domaine périphérique du cône de croissance, incluant les filopodes et les lamellipodes riches en actine, les filaments d'actine polymérisent vers les extrémités, mais sont dépolymérisés au niveau central par la myosine, ce qui engendre un équilibre et donc pas d'avancée nette du cône de croissance **(Figure 25)** (Goldberg, J. L., 2003). La myosine induit un flux rétrograde et bloque l'avancée des microtubules. Certains signaux peuvent supprimer ce flux rétrograde et ainsi permettre la progression du cône de croissance. De plus, l'absence de flux rétrograde permet aux microtubules de polymériser et ainsi d'étendre l'axone. Ainsi, la balance entre la polymérisation antérograde et la rétractation rétrograde détermine la progression de l'axone.

Une grande variété de signaux extracellulaires a été impliquée dans la croissance axonale. Les signaux les plus reconnus sont le NGF (*nerve growth factor*), le BDNF (*brain-derived neurotropic factor*), la NT-3 (*neurotrophin -3*) et la NT-4/5 (*neurotrophin-4/5*) (Goldberg, J. L., 2003). Grâce à l'utilisation des chambres de Campenot, permettant la séparation du milieu

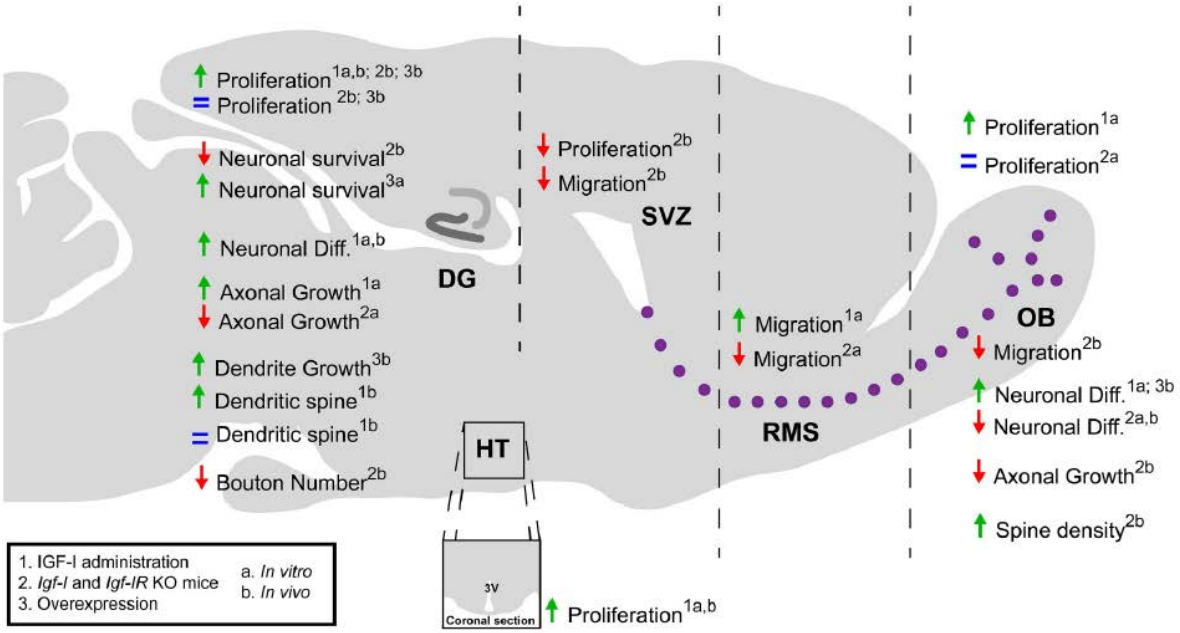

Figure 26 : Représentation schématique du rôle de l'IGF-1 au cours de la neurogenèse postnatale. L'IGF-1 a une action sur la prolifération, la différenciation, la migration neuronale, le développement des dendrites et des axones. Son action est dépendante de la sous population neuronale. Abréviations : 3V, 3ème ventricule ; DG, gyrus denté ; HT, hypothalamus ; OB, bulbes olfactifs ; RMS, courant de migration rostrale ; SVZ, zone sous-ventriculaire. D'après Nieto-Estevez, V. *et al.* (Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016).

au niveau du soma et de l'axone, il a ainsi été montré que ces facteurs neurotrophiques agissent au niveau du cône de croissance, majoritairement par l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK (Atwal, J. K. *et al.*, 2000).Ces voies régulent respectivement la synthèse de protéine et l'activité transcriptionnelle.

B. Rôle de l'IGF-1 dans la neurogenèse

Les données actuelles suggèrent que l'IGF-1 est un des facteurs essentiels au développement correct du cerveau et est extrêmement pléiotrope. Son récepteur l'IGF-1R est fortement exprimé dans le cerveau dès le développement fœtal. On le retrouve notamment dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet, l'hypothalamus et la moelle épinière (Fernandez, A. M. *et al.*, 2012). Globalement, il a été impliqué dans toutes les phases du neuro-développement, ainsi que dans la stimulation de la myélinisation (Netchine, I. *et al.*, 2011) (Joseph D'Ercole, A. *et al.*, 2008). Ainsi, l'IGF-1 a été impliqué dans la prolifération, la différenciation, la migration neuronale, ainsi que dans la mise en place des dendrites et la croissance axonale **(Figure 26)** (Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). Néanmoins, l'absence de reproduction à l'identique des divers effets de l'IGF-I selon les modèles cellulaires utilisés laisse à penser que l'IGF-1 pourrait présenter des effets dépendants de la sous-population neuronale. Ces points seront développés ci-dessous.

La prolifération des progéniteurs neuronaux est une étape importante dans les phases précoces du développement du SNC. De nombreuses études ont démontré que l'IGF-1 stimule la prolifération des cellules neurales *in vitro* et *in vivo* par l'intermédiaire de son récepteur IGF-1R qui active les voies de signalisations PI3K/AKT et MAPK (Vicario-Abejon, C. *et al.*, 2003; Otaegi, G. *et al.*, 2006; Yuan, H. *et al.*, 2015; Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). Cette action a été confortée par des approches génétiques. Ainsi, les souris *Igf-1r*$^{-/-}$ présentent une diminution de 38% du poids du cerveau et des contenus en myéline (Beck, K. D. *et al.*, 1995). De même, les souris mutantes pour l'IGF-1R (*Igf-1r*$^{-/-}$) spécifiquement au niveau des neurones présentent une microcéphalie à la naissance (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Fernandez, A. M. *et al.*, 2012). A l'inverse, les souris sur-exprimant l'IGF-1 de manière ubiquitaire présentent une augmentation de 55% du poids du cerveau, de la taille et du nombre des

cellules, ainsi qu'une augmentation de 130% des contenus en myéline, en raison d'une activité accrue des oligodendrocytes (Carson, M. J. *et al.*, 1993). De manière similaire, les souris sur-exprimant l'IGF-1 au niveau du cerveau, sous le contrôle du promoteur Nestin, actif dans les progéniteurs neuronaux, présentent une augmentation de la taille du cerveau dès 18 jours de vie embryonnaire ($E_{18.5}$) (Hodge, R. D. *et al.*, 2004; Popken, G. J. *et al.*, 2004). L'étude des mécanismes sous-jacents suggère que l'IGF-I induirait une augmentation de la vitesse du cycle cellulaire *via* une diminution de la durée de la phase G1 (Hodge, R. D. *et al.*, 2004; Popken, G. J. *et al.*, 2004). Au niveau de l'hypothalamus particulièrement, des études indiquent que l'IGF-1 peut également stimuler la neurogenèse. En effet, l'addition d'IGF-1 *in vitro* sur des cultures cellulaires issus d'hypothalamus embryonnaire de rat ($E_{16.5}$) engendre une augmentation de la prolifération cellulaire (Torres-Aleman, I. *et al.*, 1990; Torres-Aleman, I. *et al.*, 1990; Perez-Martin, M. *et al.*, 2010).De plus, une injection d'IGF-1 par voie intra-cérébroventriculaire (icv) chez le rat adulte est capable d'induire une augmentation du nombre de neurones et de cellules gliales au niveau de l'hypothalamus, labélisés par un marquage BrdU (Perez-Martin, M. *et al.*, 2010; O'Kusky, J. *et al.*, 2012). Ces données indiquent un rôle de l'IGF-I qui se maintient après le développement et qui touche à la fois la prolifération des progéniteurs neuronaux et des cellules gliales. De plus, ces données suggèrent que l'IGF-I pourrait favoriser la différenciation neuronale.

Dans ce sens, plusieurs études ont montré par des approches *in vitro* et *in vivo* que le système IGF-1/IGF-1R permettait également de réguler la différenciation des neurones issus des cellules souches neuronales au cours du développement de l'embryon ainsi que dans le cerveau adulte (SVZ (zone sous ventriculaire) et SGZ (zone sous granulaire) du gyrus denté de l'hippocampe qui constituent les niches neurogéniques). Cette régulation se ferait majoritairement par la voie PI3K/AKT (O'Kusky, J. R. *et al.*, 2000; Otaegi, G. *et al.*, 2006; Carlson, S. W. *et al.*, 2014; Yuan, H. *et al.*, 2015; Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). Aussi, en parallèle de la différenciation des neurones, l'étape de migration des progéniteurs vers leur destination finale est cruciale pour le fonctionnement du système nerveux. De multiples facteurs peuvent être impliqués dont l'IGF-1. En effet, l'IGF-1 permet de stimuler la migration neuronale *in vitro* dans les cultures de neuroblastomes (Russo, V. C. *et al.*, 2005; Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). De plus, des données issues de cultures primaires d'explants de souris *Igf-1*$^{-/-}$ âgées de 5 jours (P5) ont suggéré que l'IGF-1 serait impliqué dans la migration des neuroblastes de la zone sous-ventriculaire de l'hippocampe (SVZ) vers les

bulbes olfactifs. L'étude des voies de signalisations qui pourraient être impliquées dans ces effets suggère un rôle primordiale de la voie PI3K/AKT (Hurtado-Chong, A. *et al.*, 2009).

Enfin, les dernières étapes de la maturation neuronale, qui permettent la mise en place de la connectivité du réseau neuronale, impliquent la dendritogenèse, l'axogenèse, et la synaptogenèse. Plusieurs études ont suggéré un rôle de l'IGF-1 dans ces différentes étapes ainsi que dans la chimio-attraction (Fernandez, A. M. *et al.*, 2012; Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). Dans ce sens, l'IGF-1 a été associé à l'augmentation de la taille et de la complexité de l'arborisation dendritique *in vitro.* En effet, le traitement des cellules pyramidales de cortex issues de rats âgés de 10 jours par de l'IGF-1 montre une augmentation du nombre de dendrites ainsi que de leur taille (Niblock, M. M. *et al.*, 2000). Cette stimulation de l'arborisation dendritique est également observée dans les cultures d'hippocampe de rat ($E_{19.5}$) et de cellules de neuroblastomes humains (Kim, B. *et al.*, 1997; Jaworski, J. *et al.*, 2005). Cet effet semble dépendant des voies PI3K/AKT (Jaworski, J. *et al.*, 2005) et MAPK (Kim, B. *et al.*, 1997).

De plus, comme dit précédemment, plusieurs études démontrent *in vitro* que l'IGF-1 est essentiel à la détermination de l'axone au cours des premières phases de différenciation neuronale (Pfenninger, K. H. *et al.*, 2003). Cette polarisation de l'axone se visualise par une expansion de la membrane plasmique au niveau du cône de croissance par l'intermédiaire de l'isoforme IGF-1$R_{\beta gc}$ qui est fortement enrichie au niveau des cônes de croissance (Pfenninger, K. H. *et al.*, 2003; Laurino, L. *et al.*, 2005; Sosa, L. *et al.*, 2006). Au cours des phases plus tardives du développement neuronal, l'IGF-1R a été impliqué dans le contrôle du guidage axonal au niveau du bulbe olfactif. L'IGF-1 semble ainsi présenter un effet chimio-attractif sur certains types neuronaux (Scolnick, J. A. *et al.*, 2008). En effet, les souris *Igf-1r*$^{-/-}$ présentent dès $E_{15.5}$ une altération de l'innervation du bulbe olfactif. Ce défaut d'innervation n'impacterait pas la croissance axonale et serait principalement dû à une altération du guidage axonale. L'étude de Scolnick *et al.* suggère que l'effet de l'IGF-1 sur la chimio-attraction semblerait dépendant de la voie de signalisation PI3K/AKT (Scolnick, J. A. *et al.*, 2008).

Concernant la croissance axonale, l'IGF-1 a également été associé *in vivo* et *in vitro* avec une stimulation de celle-ci dans certaines sous-populations neuronales comme les motoneurones corticospinaux (Ozdinler, P. H. *et al.*, 2006). Chez le rat adulte, il a également été démontré que l'IGF-1 peut induire une régénération des axones par une stimulation de la croissance axonale de certains neurones suite à une lésion de la moelle épinière (Hollis, E. R., 2nd *et al.*, 2009). Cependant certaines sous-populations neuronales ne semblent pas présenter la même sensibilité à l'IGF-1 pour la croissance axonale. En effet, dans l'étude de Hollis, l'IGF-1 n'impacte pas la croissance axonale des motoneurones corticospinaux à la différence de l'étude de Ozdinler (Ozdinler, P. H. *et al.*, 2006; Hollis, E. R., 2nd *et al.*, 2009). Enfin, l'IGF-1 n'est semble-t-il pas impliqué dans la croissance axonale des neurones olfactifs *in vivo* et *in vitro* (Scolnick, J. A. *et al.*, 2008). Ainsi, la sensibilité des neurones à la croissance axonale induite par l'IGF-1 semble varier en fonction de la sous-population neuronale. Enfin, l'IGF-1 a également été associé *in vivo* à la synaptogenèse des neurones du gyrus denté de l'hippocampe (O'Kusky, J. R. *et al.*, 2000; Carlson, S. W. *et al.*, 2014).

Il est également à noter que l'IGF-1 est bien connu pour son rôle global sur la survie cellulaire. En accord avec cela, l'IGF-1 apparait important pour la survie neuronale *via* son rôle anti-apoptotique, observé *in vivo* et *in vitro*. Il apparait comme un facteur important pour la survie des progéniteurs neuronaux, des cellules corticales, des motoneurones, des cellules de Purkinje et des neurones des bulbes optiques, en période prénatale et postnatale précoce (Popken, G. J. *et al.*, 2004; Otaegi, G. *et al.*, 2006; Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). Ce rôle de l'IGF-1 sur la survie neuronale semble notamment dépendant de la voie PI3K/AKT (Bonni, A. *et al.*, 1999; Brunet, A. *et al.*, 2001). De manière importante, le rôle de l'IGF-1 sur la survie va au delà de la période de neurogenèse et du développement cérébral car il semble être maintenu chez l'adulte. En effet, il a notamment été suggéré que l'IGF-1 pourrait prévenir la mort cellulaire observée dans les maladies neurodégénératives. En effet, l'injection d'IGF-1 chez les patients atteints d'ataxie semble stabiliser la progression de la maladie (Arpa, J. *et al.*, 2011). De même, plusieurs études démontrent le rôle bénéfique de l'IGF-1 dans la maladie d'Alzheimer (Duron, E. *et al.*, 2012; Fernandez, A. M. *et al.*, 2012; Dupraz, S. *et al.*, 2013; Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). Cependant, certaines études semblent suggérer que l'IGF-1 pourrait promouvoir la production d'amyloïdes β et que l'invalidation de l'IGF-1R dans les neurones, dans des modèles de souris Alzheimer, diminuerait la présence de plaques amyloïdes β et favoriserait la mémoire spatiale de ces dernières (Gontier, G. *et al.*, 2015). Ces

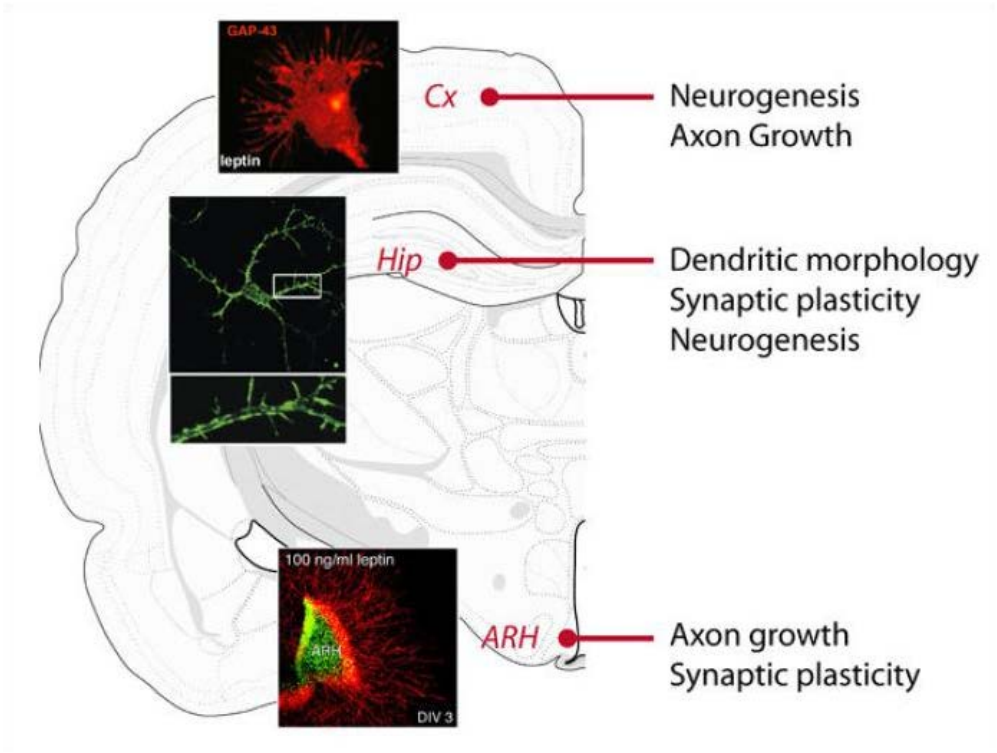

Figure 27 : Représentation de l'action neuro-développementale de la leptine sur le cerveau. Au cours de la période périnatale, la leptine est requise pour le développement correct de certaines zones du cerveau en régulant la neurogenèse et la maturation des neurones. De plus à l'âge adulte la leptine peut affecter la plasticité du cerveau en entraînant des réarrangements synaptiques au niveau hypothalamique et en influençant la prolifération cellulaire au niveau de l'hippocampe. D'après Bouret, S. G. (Bouret, S. G., 2010).

résultats contradictoires pourraient suggérer que l'action de l'IGF-1 serait en partie dépendante du contexte. En effet, avant le développement des plaques amyloïdes, la diminution de l'IGF-1 semble être neuroprotectrice. Cependant, l'IGF-1 deviendrait bénéfique après le début de la maladie (Fernandez, A. M. *et al.*, 2012).

C. Rôle de la leptine dans la neurogenèse

La leptine a également été impliquée dans plusieurs phases de neurodéveloppement au niveau de trois zones distinctes du cerveau : le cortex, l'hippocampe et enfin l'hypothalamus **(Figure 27)** (Bouret, S. G., 2010; Cottrell, E. C. *et al.*, 2010). En effet, les souris déficientes en leptine ($Lep^{ob/ob}$) ainsi que les souris déficientes pour le récepteur à la leptine ($Lepr^{db/db}$) présentent des cerveaux plus petits à la naissance (Ahima, R. S. *et al.*, 1999). Le récepteur à la leptine est abondamment exprimé dans le cortex en période périnatale et les souris $lep^{ob/ob}$ présentent une diminution du nombre de neurones corticaux dès 16 jours embryonnaire ($E_{16.5}$). Une injection de leptine à $E_{14.5}$ chez ces souris rétablit la prolifération des neurones corticaux. La leptine permettrait donc de stimuler la prolifération des neurones du cortex chez l'embryon (Udagawa, J. *et al.*, 2006; Bouret, S. G., 2010). De plus, la leptine a été directement associée avec la neurogenèse de l'hippocampe adulte *in vitro* et *in vivo,* notamment *via* la stimulation de la prolifération cellulaire au niveau du gyrus denté. Cette action semblerait passer par l'intermédiaire des voies JAK/STAT et PI3K/AKT (Garza, J. C. *et al.*, 2008). L'action de la leptine semble être directe au niveau du cerveau, puisque la délétion du récepteur à la leptine au niveau des neurones spécifiquement résulte en un phénotype identique aux souris $Lepr^{db/db}$ (Cohen, P. *et al.*, 2001). De plus, la leptine a été impliquée dans la morphologie des neurones de l'hippocampe. En effet, O'Malley et ses collègues ont montré *in vitro* que l'addition de leptine sur des cultures de neurones hippocampiques de rats néonataux stimulait la densité des dendrites et la migration neuronale (O'Malley, D. *et al.*, 2007).

La leptine a également été associée avec la croissance axonale des neurones hypothalamiques régulant la prise alimentaire en période périnatale (Bouret, S. G. *et al.*, 2006; Bouret, S. G., 2010). En effet, les souris mutantes $Lep^{ob/ob}$ présentent un défaut de la densité

d'innervation des noyaux paraventriculaires (PVN) par les neurones à NPY/AgRP et POMC/CART de manière permanente (Bouret, S. G. *et al.*, 2004). De même, les rats Zucker déficients pour le récepteur de la leptine (fa/fa rats) présentent également un défaut d'innervation du PVN par les neurones à NPY et POMC (Bouret, S. G. *et al.*, 2007; Bouret, S. G. *et al.*, 2008; Kirk, S. L. *et al.*, 2009). Les cultures d'explants de noyaux arqués de l'hypothalamus montrent une croissance axonale augmentée d'environ 2.5 fois pour les neurones à NPY et POMC suite à un traitement par la leptine pendant 36 heures (Bouret, S. G. et al., 2008). L'injection de leptine in vivo en période postnatale précoce sur les souris Lepob/Lepob permet un sauvetage phénotypique et restaure la densité d'innervation du PVN (Bouret, S. G. et al., 2004). Il est important de noter que l'administration de leptine à l'âge adulte chez ces souris ne permet pas de rétablir une innervation correcte du PVN. De plus, au sein de la population de neurones à NPY/AgRP du noyau arqué des données suggèrent une sensibilité différente à la leptine en fonction de la cible d'innervation (Bouyer, K. et al., 2013). Cependant, il semble que l'injection à l'âge adulte puisse engendrer une modification de l'organisation synaptique entres les neurones à NPY et POMC et rétablirait en partie l'excitabilité des neurones à POMC (Pinto, S. *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que la leptine pourrait également réguler la plasticité neuronale (Bouret, S. G., 2010). Dans ce sens, il a également été montré *ex vivo* que la leptine pouvait être nécessaire à la mise en place des synapses de l'hippocampe en période néonatale par l'intermédiaire de la voie des MAPK (O'Malley, D. *et al.*, 2007; Bouret, S. G., 2010).

D'autres populations neuronales semblent également sensibles à la stimulation de la croissance axonale par la leptine. En effet, la leptine a été suggérée comme impliquée dans la croissance axonale des neurones à kisspeptine situés dans le noyau arqué et impliqués dans la régulation de l'axe gonadotrope (Caron, E. *et al.*, 2012). Ainsi, une altération de la nutrition au cours de la période postnatale précoce (lactation) chez la souris engendre un défaut d'innervation par les neurones à kisspeptine situés dans l'ARC, sur les neurones GnRH et ainsi un retard de l'âge de la puberté. De manière cohérente, les souris $Lep^{ob/ob}$ présentent un retard de puberté et sont infertiles, en revanche, l'administration de leptine aux souris WT juvéniles engendre une puberté précoce (Chehab, F. F. *et al.*, 1997). Les neurones à kisspeptine semblent ainsi établir le lien entre fertilité et statut nutritionnel (Hameed, S. *et al.*, 2011). De même, la croissance axonale *in vitro* des neurones corticaux est stimulée de trois fois en présence de leptine (Bouret, S. G., 2010). La stimulation de la croissance axonale par

la leptine semble impliquer les voies de signalisations MAPK et PI3K/AKT mais pas JAK/STAT (Valerio, A. *et al.*, 2006; Bouret, S. G., 2010). Ces résultats démontrent donc l'importance de la leptine sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué, comprenant notamment les neurones régulant la prise alimentaire, les neurones kisspeptinergiques, ainsi que la croissance axonale des neurones corticaux.

D. Rôle de l'insuline dans la neurogenèse

Les études sur le rôle de l'insuline au niveau de la neurogenèse semblent indiquer un impact plus limité. L'implication de l'insuline dans le neurodéveloppement apparait particulièrement importante pour la survie cellulaire. En effet, l'addition d'insuline à des cultures neuronales *in vitro* permet d'améliorer la survie neuronale, et ce sans effet dose-dépendant (Rhee, Y. H. *et al.*, 2013). Ainsi, les milieux de culture sont régulièrement supplémentés avec de l'insuline afin d'assurer une viabilité neuronale (Rhee, Y. H. *et al.*, 2013). Cet effet semble également dépendant de la voie PI3K/AKT. *In vivo*, l'insuline semble également jouer un rôle neuroprotecteur. En effet, certains essais cliniques montrent qu'une administration intra-nasale d'insuline permet de maintenir la mémoire des patients atteints d'Alzheimer (Craft, S. *et al.*, 2012).

En revanche, l'insuline ne semble pas être impliquée dans la prolifération des cellules neurales. Ainsi, l'ablation du récepteur à l'insuline spécifiquement au niveau neuronal n'entraîne pas d'altération du poids du cerveau ou de sa morphologie dans le modèle murin (Bruning, J. C. *et al.*, 2000). En outre, il a été montré que l'insuline permet de stimuler *in vitro* la différenciation neuronale des cellules progénitrices neurales, par l'intermédiaire de la voie PI3K/AKT (Han, J. *et al.*, 2008).

L'insuline a également été impliquée dans la morphogenèse des neurones. Elle a notamment été montrée comme stimulant la mise en place des dendrites *in vitro* dans les cultures primaires d'hippocampe, par l'intermédiaire de l'activation de la voie PI3K/AKT (Lee, C. C. *et al.*, 2011).

Enfin, le rôle de l'insuline sur la croissance axonale des neurones régulant la prise alimentaire a également été suggéré par l'équipe de Brüning. Leur étude indique que suite à un régime riche en lipides (High Fat Diet) de la mère en période périnatale, les souriceaux présentent une fois à l'âge adulte un défaut d'innervation des noyaux paraventriculaires (PVN) et de l'aire latérale de l'hypothalamus (LHA) par les neurones à NPY et POMC (Vogt, M. C. *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent un potentiel rôle de l'insuline dans la régulation de la croissance axonale de ces neurones (Vogt, M. C. *et al.*, 2014). Les récepteurs à l'insuline et à l'IGF-1 ainsi que les voies de signalisations étant très proches, ces deux hormones pourraient avoir des effets partagés sur la survie et la différenciation des neurones.

V. Objectifs de la thèse

Notre équipe a précédemment montré que la nutrition au cours de la période postnatale précoce programme l'activité de l'axe somatotrope à l'âge adulte (GH/IGF-1). En effet, une restriction alimentaire transitoire en période postnatale précoce au cours de la lactation (1er au 16ème jour de vie) induit une diminution des taux plasmatiques des hormones nutritionnelles IGF-1, leptine et insuline dès les premiers jours de vie, et altère la croissance des souriceaux de manière permanente (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Cette altération permanente de la croissance est associée à des taux adultes d'IGF-1, d'ALS et des contenus hypophysaires en GH diminués, et est également associé à une augmentation de la susceptibilité des souris à développer des pathologies cardio-métaboliques à l'âge adulte (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Ces observations sont en accord avec le concept de l'origine développementale de la santé et des pathologies adultes (DOHaD). Cette programmation postnatale précoce de la croissance et de l'axe somatotrope semble particulièrement impliquer les IGFs. En effet, les souris hétérozygotes pour l'IGF-1R au niveau du système nerveux central (SNC-*Igf-1r*$^{+/-}$) présentent le même phénotype de croissance que les souris restreintes. Une partie de cette programmation implique une diminution transitoire de l'innervation de l'éminence médiane par les neurones à GHRH à 10 jours de vie. Cette altération est associée à une hypoplasie hypophysaire en cellules somatotropes permanente dès 20 jours de vie (Kappeler, L. *et al.*, 2008).

L'objectif de ma thèse a été d'étudier l'impact de la nutrition périnatale sur la mise en place de l'axe somatotrope. Le défaut transitoire d'innervation de l'éminence médiane par les axones des neurones à GHRH étant crucial dans l'induction de l'hypoplasie en cellules somatotropes, je me suis focalisée sur ce point. Le premier objectif de ma thèse a donc été d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation du développement des neurones à GHRH par la nutrition durant la lactation, et plus précisément d'étudier l'impact de l'IGF-1. Pour cela, nous avons réalisé des cultures *in vitro* d'explants de noyaux arqués d'hypothalamus issus de souriceaux âgés de 7 jours.

Dans un deuxième temps, j'ai étudié l'impact de deux autres hormones fortement régulées par la nutrition : la leptine et l'insuline. En effet, suite à une restriction alimentaire, les souris présentent une diminution des taux plasmatiques en leptine et en insuline à 10 jours de vie (Kappeler, L. *et al.*, 2009). De plus, ces hormones ont notamment été associées avec l'innervation des neurones régulant la prise alimentaire localisés dans le noyau arqué et pourrait donc également être impliquées dans la programmation des neurones à GHRH également localisés dans l'ARC (Bouret, S. G. *et al.*, 2004; Vogt, M. C. *et al.*, 2014).

Enfin, j'ai initié l'étude d'une dénutrition durant la période fœtale sur la mise en place de l'axe somatotrope afin de déterminer l'étendue de la fenêtre de programmation de cet axe.

RESULTATS

Etude de l'impact de l'alimentation postnatale précoce sur la mise en place de l'axe somatotrope

I

Article:

IGF-1 Induces GHRH Neuronal Axon Elongation in Response to Nutrition during Early Postnatal Life in Mice.

Contexte :

La nutrition en période postnatale précoce, durant la lactation, programme l'activité de l'axe somatotrope (GH/IGF-1). Celui-ci contrôle le développement staturo-pondéral postnatal, et joue également un rôle important dans la régulation du métabolisme à l'âge adulte. Ainsi, une modification de la nutrition au cours de cette période altère de façon permanente la croissance des souris et favorise également l'émergence des pathologies de type cardio-métabolique à l'âge adulte (Kappeler, L. *et al.*, 2009). En effet, la restriction nutritionnelle en période postnatale précoce engendre une diminution des taux plasmatiques en IGF-1 ainsi qu'une hypoplasie hypophysaire en cellules somatotropes à partir de 20 jours de vie chez la souris (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Cette hypoplasie semble être induite par la baisse de l'expression à 10 jours de vie de PIT1, sous le contrôle du GHRH, et qui permet la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes. Cette modification du développement de l'axe somatotrope passerait par la signalisation de l'IGF-1. En effet, la souris *Igf-1r*$^{+/-}$ spécifiquement au niveau du cerveau présente un phénotype similaire (Kappeler, L. *et al.*, 2008). De plus, il a pu être observé chez ces dernières un défaut transitoire d'innervation de l'éminence médiane par les neurones à GHRH à 10 jours de vie (Kappeler, L. *et al.*, 2008). Ces données indiquent que la programmation de l'axe somatotrope par la nutrition postnatale précoce impliquerait fortement la signalisation IGF-1, et suggèrent qu'un des mécanismes cruciaux se situe au niveau du développement des neurones à GHRH.

Objectif :

L'objectif de cette étude est de comprendre l'impact de la nutrition sur la mise en place des neurones à GHRH, et plus particulièrement le rôle de l'IGF-1. Cette étude a été menée sur des souris C57 Bl/6J GHRH-eGFP. Nous avons donc tout d'abord vérifié le maintien du phénotype induit par la restriction alimentaire au cours de la lactation sur ce fond génétique, puisque les précédents résultats avaient été obtenus sur le fond génétique C57 Bl/6J x 129/SvPas (Kappeler, L. *et al.*, 2009). L'IGF-1 étant un facteur proliératif et anti-apoptotique bien connu, nous avons étudié par la suite si la diminution des taux d'IGF-1 engendrée par une restriction alimentaire induisait une altération du nombre de neurones à GHRH. D'autre part, l'IGF-1 ayant des fonctions bien décrites sur la neurogenèse au cours du développement, nous avons également étudié le rôle de l'IGF-1 sur la croissance axonale des neurones à GHRH.

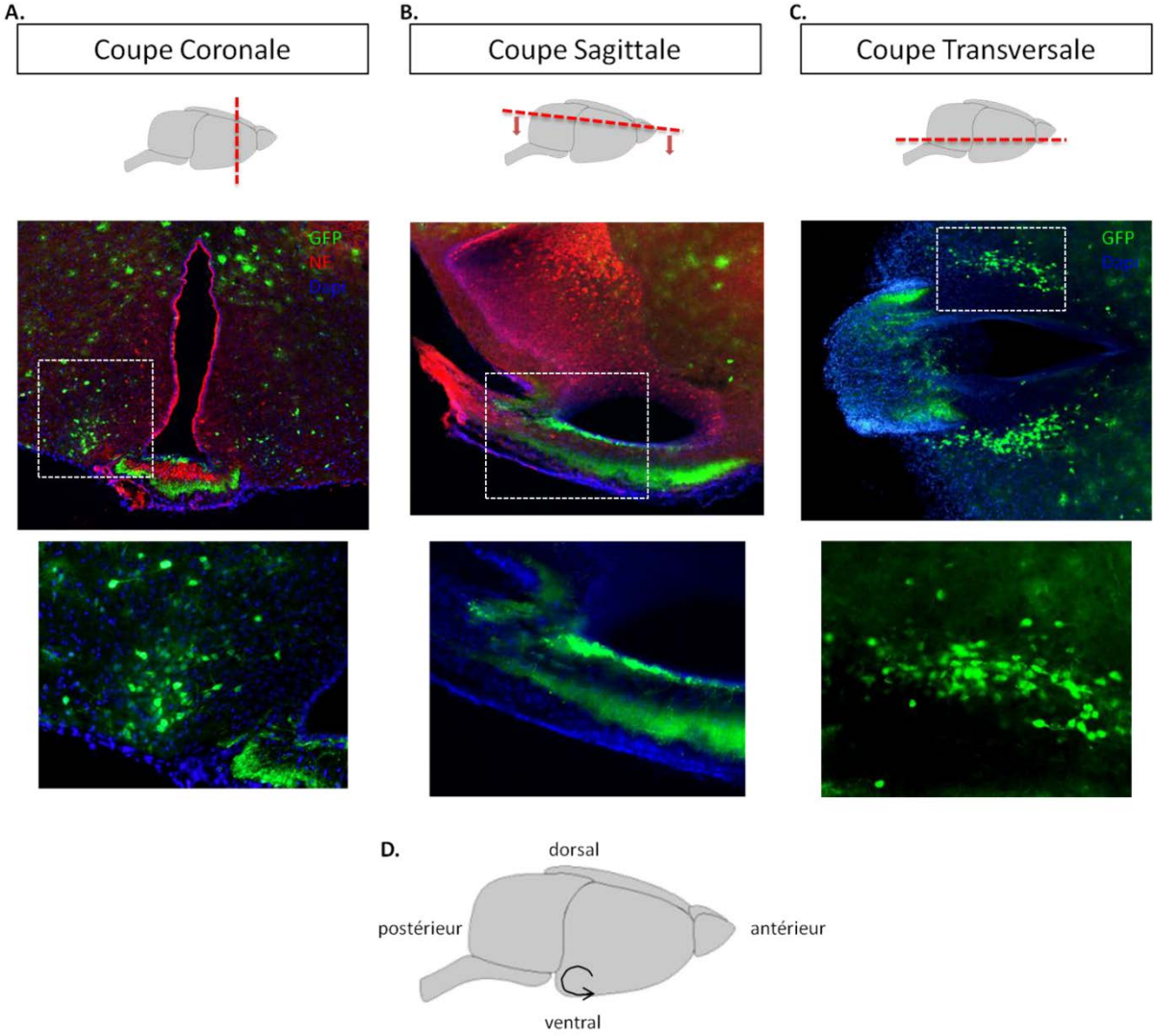

Figure 28 : Immunomarquage des neurones à GHRH de cerveaux de souriceaux GHRH-eGFP âgés de 7 jours normalement nourris selon différents plans de coupes. Marquage des neurones à GHRH par un anticorps anti-GFP (vert (A. – C.)), neurofilament (rouge (A. et B.)), et une coloration nucléaire au Dapi (bleu (A. – C.)) sur des coupes au cryostat réalisées selon différents plans : coupe coronale **(A.)**, coupe sagittale **(B.)** et coupe transversale **(C.)**. Représentation du trajet supposé des neurones à GHRH **(D)**.

Pour mener cette étude, nous avons utilisé des souris C57 Bl/6J_GHRH-eGFP (Balthasar, N. *et al.*, 2003). A la naissance, la taille des portées a été normalisée pour avoir des portées de 6 ou 10 petits par mère afin d'induire respectivement une nutrition normale ou restreinte au cours de la lactation, sans induire le stress d'une séparation maternelle prolongée (Fiorotto, M. L. *et al.*, 1991; Caldji, C. *et al.*, 1998). Afin de pouvoir étudier un éventuel rôle de la nutrition sur la croissance axonale des neurones à GHRH, nous avons réalisé dans un premier temps des coupes de cerveaux selon différents plans de coupes afin de tenter de suivre les axones des neurones à GHRH **(Figure 28)**. Il est extrêmement difficile de suivre les axones des neurones à GHRH quel que soit le plan de coupe utilisé. En effet, nous avons observé que les neurones à GHRH localisés dans le noyau arqué semblaient innerver la base de l'éminence médiane depuis le plancher du troisième ventricule, mais pas de manière directe **(Figure 28 A)**. La coupe sagittale suggérait également que ces neurones semblaient innerver l'EM par le plancher du 3ème ventricule, et en arrivant de manière dorso-postérieure **(Figure 28 B)**. La coupe transversale confirmait l'arrivée postérieure des axones GHRH positifs et suggérait également une arrivée latérale **(Figure 28 C)**. Ainsi, nos résultats soumettent donc l'idée que les axones des neurones à GHRH du noyau arqué innervent l'éminence médiane au niveau ventral par une boucle dorso-postérieure **(Figure 28 D)**. Cette boucle dorso-postérieure rend ces axones très difficiles à suivre *in vivo*.

Aussi, afin de tester le rôle de l'IGF-1 sur la croissance axonale, nous avons réalisé des cultures *in vitro* d'explants de noyau arqué d'hypothalamus micro-disséqués à partir de cerveaux de souriceaux âgés de 7 jours normalement nourris, selon la technique mise en place au laboratoire par Erik Mire (Lopez-Bendito, G. *et al.*, 2006; Mire, E. *et al.*, 2012). A la suite d'un traitement par l'IGF-1 durant 24H, différentes immuno-histochimies ont été réalisées afin de marquer tous les neurones du noyau arqué par un marquage neurofilament (NF), et les neurones à GHRH par un marquage GFP, ou les neurones à NPY/AgRP par un marquage AgRP. La longueur des axones a ensuite été mesurée en condition basale et traitée. De plus, afin de déterminer si la diminution d'IGF-1 observée chez les souriceaux restreints induisait le défaut d'innervation de l'éminence médiane par les axones des neurones à GHRH, j'ai mesuré la croissance axonale selon la même méthode sur des explants issus de souriceaux restreints. Ces données sont rassemblées dans l'article « *IGF-1 Induces GHRH neuronal Elongation in response to Nutrition during early postnatal life in Mice* » en cours de soumission.

IGF-1 Induces GHRH Neuronal Axon Elongation in Response to Nutrition during Early Postnatal Life in Mice.

Lyvianne Decourtye[§,1], Erik Mire[§,1], Maud Clemessy[1], Victor Heurtier[1], Tatiana Ledent[1], Iain C. Robinson[2], Patrice Mollard[3], Jacques Epelbaum[4], Michael J. Meaney[5], Sonia Garel[6], Yves Le Bouc[1], Laurent Kappeler[1*]

1- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMRS 938, Centre de Recherche St-Antoine (CRSA), 184 rue du Fbg St-Antoine, 75012 Paris, France;

2- MRC, National Institute for Medical Research, Division of Molecular Neuroendocrinology, London, UK;

3- Universités Montpellier 1 and 2, CNRS, UMR 5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, 34000 Montpellier, France;

4- Sorbonne Paris Cité, Université Paris Descartes, INSERM, UMR 894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, 75014 Paris, France; present address: UMR 7179 CNRS MNHN - MECADEV: Mécanismes Adaptatifs et Evolution, 91800 Brunoy, France

5- McGill University, Douglas Mental Health University Institute, Montreal, Canada;

6- Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, 75005 Paris, France;

Abbreviated title: IGF-I stimulates GHRH neuron axon growth

Key words: Axon growth, nutrition, hypothalamus

Corresponding author: Laurent Kappeler, Centre de Recherche St-Antoine (INSERM-UPMC UMRS 938), Hôpital St-Antoine, 184 rue du Faubourg St-Antoine, 75012 Paris, France. laurent.kappeler@inserm.fr

Funding: This study was supported by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM), *l'Université Pierre et Marie Curie* (Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06), the *institute of Cardiometabolism and Nutrition* (IHU ICAN), *Sandoz-France laboratories*, and the *Premup foundation*. P.M. was supported by an ANR grant (ANR-2010-BLAN-1415-01). E.M. was supported by CDD-Inserm. L.D. was supported by a PhD grant from the French Ministry for Education and Research Training and from the Société Française d'Endocrinologie et Diabètologie Pédiatrique (SFEDP, grant Sandoz Biopharmaceuticals France).

Disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Foot note: §These authors contributed equally to this work.

Contributions: L.D., E.M., M.C., M.J.M., S.G., Y.L.B, and L.K. designed and/or performed experiments, analyzed data, and contributed to writing the article. V.H. performed the *in situ* analysis. T.L. produced the mouse cohorts. I.C.R. and P.M. provided the GHRH-eGFP mouse model. J.E. contributed to the discussion of the results and writing of the article. L.D. and E.M. contributed equally to this work. All authors participated in discussions and revised the manuscript.

Abstract

Nutrition during the perinatal period programs body growth. Growth hormone (GH) secretion from the pituitary regulates body growth and is controlled by Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) neurons located in the arcuate nucleus of the hypothalamus. We observed that dietary restriction during the early postnatal period (i.e. lactation) in mice influences postnatal growth by permanently altering the development of the somatotropic axis in the pituitary gland. This alteration is due to the lack of GHRH signaling during this critical developmental period. Indeed, underfed pups showed decreased insulin-like growth factor I (IGF-I) plasma levels, which are associated with lower innervation of the median eminence by GHRH axons at 10 days of age relative to normally fed pups. IGF-I preferentially stimulated axon elongation of GHRH neurons in *in vitro* arcuate explant cultures from 7 day-old normally fed pups. This IGF-I stimulating effect was selective since other arcuate neurons visualized concomitantly by neurofilament labeling, or AgRP immunochemistry, did not

significantly respond to IGF-I stimulation. Moreover, GHRH neurons in explants from age-matched underfed pups lost the capacity to respond to IGF-I stimulation. Molecular analyses indicated that nutritional restriction was associated with impaired activation of AKT. These results highlight a role for IGF-I in axon elongation that appears to be cell selective and participates in the complex cellular mechanisms that link underfeeding during the early postnatal period with programming of the growth trajectory.

Introduction

Normal development of both cognitive and somatic functions requires suitable nutrition of the developing fetus and newborns during the perinatal period (McMillen, I. C. et al., 2005) Indeed, insufficient food supplies during the early postnatal period affect body growth as well as the risk of developing cardiovascular and metabolic diseases in adulthood. This is in agreement with the developmental origin of health and adult diseases (DOHaD), particularly after intrauterine growth retardation, which accounts for 5% of births (Ong, K. K. *et al.*, 2009). This programming of adult diseases, which has been validated in various animal models as well as in human populations (Hales, C. N. *et al.*, 2001; Bateson, P. *et al.*, 2004; Gluckman, P. D. *et al.*, 2004; McMillen, I. C. *et al.*, 2005), further highlights the importance of mechanisms that link the sensing of nutritional state to a shift in the developmental trajectory, which is strongly integrated with that of linear growth.

Body growth is controlled by a subset of neurons located in the hypothalamus that regulates the secretion of Growth Hormone (GH), part of the somatotropic neuro-endocrine axis. The developmental settings of the somatotropic axis are highly sensitive to early postnatal nutrition (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Kappeler, L. *et al.*, 2009), suggesting that this subset of hypothalamic neurons is particularly sensitive to nutritional supply during the perinatal period. Growth programming is also associated with the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor signaling pathway (Kappeler, L. *et al.*, 2008). Indeed, the permanent growth delay phenotype resulting from caloric nutritional restriction during lactation (Kappeler, L. *et al.*, 2009) can be genetically mimicked by tissue-specific heterozygous inactivation of the IGF-1 receptor (IGF-1R) in the central nervous system (Kappeler, L. *et al.*, 2008).

GH is secreted from pituitary somatotroph cells under the regulation of two hypothalamic neurohormones, Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) that stimulates GH secretion, and Somatostatin (SRIH) that inhibits it. Previous reports suggest that GHRH neurons located in the arcuate nucleus of the hypothalamus are a key element that influences programming of the growth trajectory (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Solloso, A. *et al.*, 2008; Kappeler, L. *et al.*, 2009). Both heterozygous invalidation of IGF-1R or nutritional restriction during lactation in wild type mice seem to decrease GHRH signaling to the pituitary at 10 days of age, leading to permanent pituitary hypoplasia of GH-producing somatotroph cells by 20 days of age. These findings are in agreement with previous studies on the role of GHRH and Pit-1 on pituitary development (Solloso, A. *et al.*, 2008). Moreover, they suggest that the reprogramming of the somatotropic axis by nutritional restriction foremost involves GHRH neurons during the first week of life, when the GHRH neurons of the hypothalamus are still developing, through an underlying mechanism that remains to be deciphered.

Developing arcuate neurons may be highly sensitive to IGF-I signaling because the mediobasal hypothalamus is strongly enriched for IGF-I receptors (Adamo, M. *et al.*, 1989; Fernandez, A. M. *et al.*, 2012). IGF-I exerts strong proliferative and anti-apoptotic effects (Nieto-Estevez, V. *et al.*, 2016). In developing brain, IGF-I signaling is also strongly associated with cellular morphogenesis: high IGF-I levels in the brain are associated with long and complex neuronal dendritic arborization (Kim, Bhumsoo *et al.*, 1997; Niblock, M. M. *et al.*, 2000; Jaworski, J. *et al.*, 2005). In addition, IGF-I may also determine axon fate through the IGF-1Rgc isoform during the early phase of neuronal differentiation (Pfenninger, K. H. *et al.*, 2003; Laurino, L. *et al.*, 2005; Sosa, L. *et al.*, 2006). During the latter phase of neuronal development, IGF-1R signaling is also implicated in the control of axon guidance in the lateral olfactory bulb (Scolnick, J. A. *et al.*, 2008). A few reports have studied the role of IGF-I in axon elongation: Ozdinler *et al.* have shown that IGF-I can stimulate axonal outgrowth in neurons (Ozdinler, P. H. *et al.*, 2006), whereas other reports suggest that all neurons do not display the same sensitivity to IGF-I (Scolnick, J. A. *et al.*, 2008; Hollis, E. R., 2nd *et al.*, 2009). Here, we determined how undernutrition during the early postnatal period affects the development of GHRH neurons. We examined the potential ability of IGF-1 to regulate axonal outgrowth of GHRH neurons, and how it is controlled by nutrition using *in vitro* arcuate explant cultures (Thissen, J. P. *et al.*, 1994; Schwartz, M. W. *et al.*, 2000).

Materials & Methods

Animal experiments. GHRH-eGFP C57Bl/6J mice (Balthasar, N. *et al.*, 2003) were housed under standard SOPF conditions in individually ventilated cages at 22 °C with a 12 h light/dark cycle and free access to water and a commercial rodent diet. Nutritional restriction only during lactation was achieved by cross-fostering at birth such that "normally fed" pups were obtained from a litter size of six pups per dam and "underfed" pups from a litter size of 10 pups per dam, as described previously (Fiorotto, M. L. *et al.*, 1991; Kappeler, L. *et al.*, 2009). After weaning, all animals (males and females) were fed *ad libitum* with a standard commercial diet. Seven days old pups were sacrificed by rapid decapitation. Older mice (P10, P90) were sacrificed under deep isofluorane anesthesia for cardiac puncture and terminal tissue harvesting. All animal procedures were performed in accordance with institutional directives for the care of laboratory animals and approved by the French national ethics committee 05 Charles Darwin (Project protocol agreement number Ce5/2012/006).

In Situ Hybridization and Immunohistochemistry. For *in situ* hybridization, 16 µm frozen sections of brain from 10 day-old male mice were prepared as described previously (Balthasar, N. *et al.*, 2003). Briefly, brain slices were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and hybridized with a digoxigenin-labeled (Roche) GHRH-RNA probe (Balthasar, N. *et al.*, 2003). Hybridized probe was detected with an alkaline phosphatase-conjugated anti-Dig antibody (Table 1) and NBT/BCIP (Promega) coloration. For brain GHRH immunohistochemistry, the entire median eminence from paraffin embedded brains from normally fed or underfed P10 male pups was sliced (7 µm thickness), and one of every ten slices were mounted on slides for the subsequent innervation analysis. The area of innervation for each slice was determined and the global ME innervation estimated for each individual (n = 3 normal and 4 underfed). After deparaffinization and rehydration, the slices were subjected to heat-induced antigen retrieval in 10 mM Citrate buffer, pH6. The slices were then incubated with anti-GHRH and anti-Panendothelial Cell Antigen MECA-32 antibodies (Table 1). Sequential incubation with secondary antibodies and revelation reagents were then performed: first, slices were incubated with a biotinylated anti-rabbit secondary antibody (Table 1), followed by amplification with the ABC Elite kit (Vector) and revealed using DAB (Dako); the slices were then incubated with biotinylated anti-rat secondary antibody (Table 1), followed by amplification with the ABC Elite kit (Vector) and revealed using VIP (Vector). The slices were mounted and visualized with an Olympus BX43 with DP73 camera. Pituitary

glands from 20 day-old male pups were fixed in 4% PFA and embedded in 20% gelatin. The choice of 20 days of age for pituitary analysis was based on the dynamics of pituitary development, as previously shown (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Kappeler, L. *et al.*, 2009). For GH immunohistochemistry, the pituitary gland was cut into 18 µm cryosections and incubated with rabbit anti-GH antibody, followed by incubation with Dylight-549 donkey anti-rabbit IgG (Table 1). The slides were mounted and then visualized with an Olympus BX612 fluorescence microscope and DP71 CCD camera under identical acquisition conditions.

Arcuate explant culture experiments. Organotypic slices of 7 day-old mice of either sex were prepared and cultured for 48 h as described previously (Lopez-Bendito, G. *et al.*, 2006). Although females are less sensitive to nutritional restriction than males, which may dampen the effects observed, arcuate nucleus explants were harvested from pups of both sexes to obtain a sufficient amount of material from each litter. Briefly, 300 µm brain slices were incubated on culture membranes (Whatmann) in MEM Medium (Life technologies) supplemented with 10% FCS, 0.5% glucose, and 1% penicillin/streptomycin. Arcuate nuclei were then microdissected and cultured in neurobasal medium (Life technologies) supplemented with methylcellulose, B-27 supplement (B-27, Life Technologies), glucose, L-glutamine, and penicillin/streptomycin (Life technologies). Of note, the B27 supplement contains insulin for neuron survival at a final concentration of 58 nM, according to our determinations (Access Ultrasensitive Insulin kit #33410 on an Access 2 automate, Beckman-Coulter). After 24 h in culture, the explants were treated with 100 ng/ml IGF-1 (13.2 nM, R&D systems) alone or in combination with 1 µM OSI-906 (Linsitinib, Selleckchem) for another 24 h. The explants were then fixed for 30 min in 4% PFA and subjected to immunohistochemistry using primary antibodies directed against neurofilament, GFP, AgRP, IGF-IR, and their corresponding secondary antibodies (See Table 1). Neurofilaments and AgRPs were visualized under a 4X objective, and GFP under a 10X objective, using an Olympus BX612 fluorescence microscope and DP71 CCD camera. The NeuronJ plugin of ImageJ software was used to analyze axon length (Mire, E. *et al.*, 2008). Briefly, the length of a maximum of 40 axons (mean ± SEM: 24.1 ± 1.5 for both normal and underfed) was measured for each explant to calculate a mean. Eight explants were cultured under each condition tested, and the global axon growth was calculated from the mean of these eight quantified explants. The global axon growth for each condition was normalized against untreated control explants for each experiment to obtain relative axon growth. The results for all stimulation experiments were normalized against their respective controls (basal condition)

due to the variability of the explant cultures. Data are presented as the mean of relative axon growth calculated from various experiments (n = 4 to 9 according to the experiment).

Biochemical analysis. Plasma IGF-1 levels were determined using the Mouse/Rat IGF-I (Mediagnost) ELISA kit according to the manufacturer's instructions. IGF-I/IGFBP complexes are dissociated during this assay and the IGFBPs are saturated with IGF-2, thus allowing the measurement of total circulating IGF-I (spectrophotometer TECAN, GENios Pro). For Western blot analysis, micro-dissected arcuate nuclei from one litter of 5-6 pups (both sexes) were recovered in neurobasal medium supplemented with B-27, without insulin, for 2 h in a separate set of experiments. Arcuate nuclei were stimulated with IGF-1 (100ng/ml) or control medium for 15 min. Proteins of stimulated and un-stimulated explants were then extracted as previously described (Weaver, I. C. *et al.*, 2014). For the cytosolic fraction, samples were homogenized in a hypertonic buffer consisting of 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, and 0.1 mM EGTA, containing a cocktail of both protease and phosphatase inhibitors (Roche). After 15 min of incubation on ice, 6.3µl of 1%NP-40 per 100 µl buffers was added, the samples vortexed briefly, and centrifuged at 5000xg for 1 min at 4°C. The resulting supernatant, enriched for the cytosolic fraction, was transferred to a new tube for analysis by Western blot. The pellet was resuspended in a second buffer consisting of 20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM EGTA. The suspension was shaken for 15 min at 4°C and centrifuged at 13 000xg for 5 min at 4°C. The pellet, enriched in membranous proteins, was resuspended in 150µL PBS. The cytosolic fraction was concentrated using the Centrifugal Filter Units Amicon Ultra kit (Millipore). The protein concentration of all fractions was then determined by nanodrop. For each sample, 10 µg of cytoplasmic proteins (AKT, MEK, ERK) or 7 µg of membrane proteins (IGF-1R) were separated on NuPAGE Bis-Tris (4-12%) gels (Life technologies) and transferred to PVDF membranes. The membranes were then incubated with primary antibodies against phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-MAP2K1, MAP2K1, phospho-AKT, AKT, Actin, phospho-IGF1R, and IGF1R, using a anti-rabbit HRP-IgG as a secondary antibody (Table 1). The membranes were then revealed with SuperSignal West Pico or Femto Chemiluminescent Substrate (37080, 34095, Thermo Scientific) using a high sensitivity, cooled charge-coupled device (CCD) 6 Mpx camera on a ChemiDoc Touch Imaging System (Biorad).

Measurement of gene expression. Gene expression was determined as described previously (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Kappeler, L. *et al.*, 2009). Briefly, total RNA from the pituitary

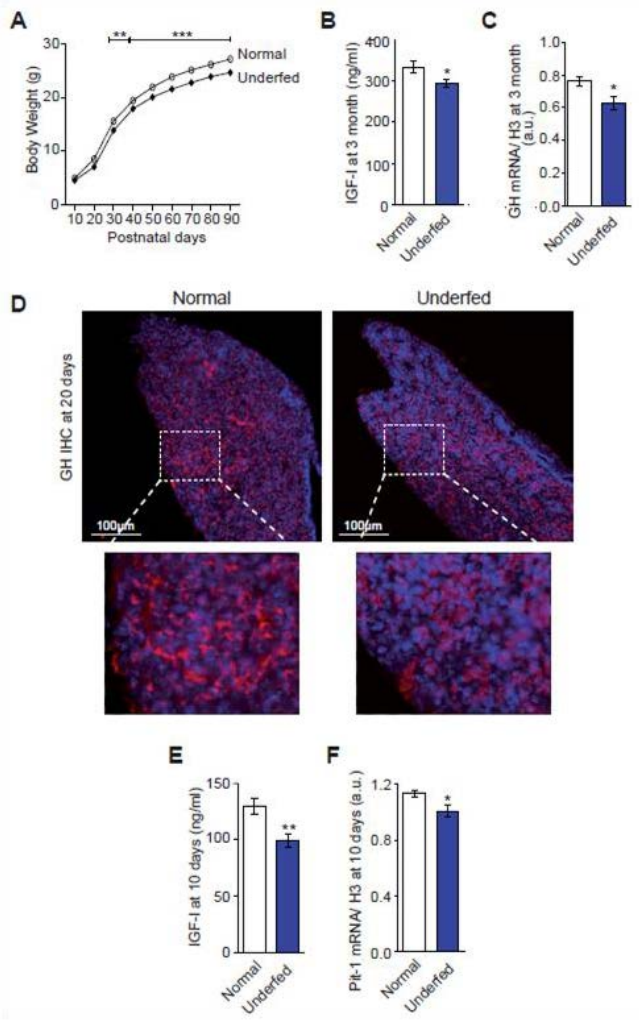

Figure 1: *Underfeeding during the early postnatal period induces a permanent growth delay*.

Increasing litter size from 6 (Normally fed) to 10 (Underfed) pups per dam in wild type C57Bl/6J mice permanently delayed postnatal growth of male pups, as observed with postnatal body weight gain (n = 23-25 per group) that persisted into adulthood (**A**). This was associated with low circulating plasma levels of IGF-I in 3 month-old mice previously underfed during lactation (n = 7-9 per group) (**B**), accompanied by decreased levels of GH mRNA in the pituitary gland (n = 9 per group) (**C**). This was preceded by pituitary hypoplasia in GH-producing somatotroph cells from 20 days of age (labeled in red, counterstaining with DAPI) (**D**). The nutritional restriction of pups was associated with lower plasma levels of IGF-1 (n = 8 per group) (**E**) and decreased expression of the somatotroph differentiation factor, Pit-1 (n = 5 per group) (**F**). All data are presented as the mean ± SEM. Gene expression determinations are normalized against the histone H3 gene (**C, F**). Comparisons were performed by repeated measure two-way ANOVA analysis (**A**) or t-test analysis (**B-F**), with * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

gland of adult male mice was extracted using the silica membrane method according to the manufacturer's instructions (NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel). Total RNA from the pituitary gland of 10-day-old mice was extracted using the phenol-chloroform method (RNAble, Eurobio). A total of 1 µg of RNA was reverse transcribed using random hexamers, RNAse inhibitor, and RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas). Real time PCR was performed in duplicate with 6 ng of cDNA on an Applied Biosystem 7300 PCR System. The primers used were GH (Fwd TCACTGCTTGGCAATGGCTA, Rv ACAGACTGGACAAGGGCATG), and Pit-1 (Fwd CACGGCTCAGAATTCAGTCA, Rv CTGATGGTTGTCCTCCGTTT). The abundance of mRNA was measured using the standard curve method and normalized against the housekeeping gene H3f3b (Fwd CCAGAAATCGACTGAGCTGCTCAT, Rv GCTGCACTTTGAAACCTCAAGTCG).

Statistical analysis. All data are presented as the mean ± SEM. Comparisons between two groups were performed using the Student t-test and the growth curve was analyzed by repeated measures Two-way ANOVA. For explant cultures, results from dual immunohistochemistry (IHC) experiments (e.g. NF/GFP) were analyzed by two-way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons, and the results of singular IHC (AgRP) were analyzed by one-way ANOVA with Newman Keuls' multiple comparison test. Statistically significant results are marked with asterisks, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Results

Underfeeding during lactation results in permanent growth delay and reduced secretion of growth hormone.

We restricted nutrition during lactation (P1-P16) in a modest and transient manner [Kappeler, 2009 #9] by increasing the litter size of wild type C57Bl6/J dams from six ("normal") to 10 ("underfed") pups, and assessed the effects of this nutritional restriction on body growth. Males from underfed (large) litters showed a delay of postnatal growth that persisted into adulthood (Figure 1A). The effect in females exhibit a lighter impact and they were not studied further (data not shown). Three month-old male adult mice subjected to nutritional restriction during lactation had lower circulating IGF-I plasma levels than mice

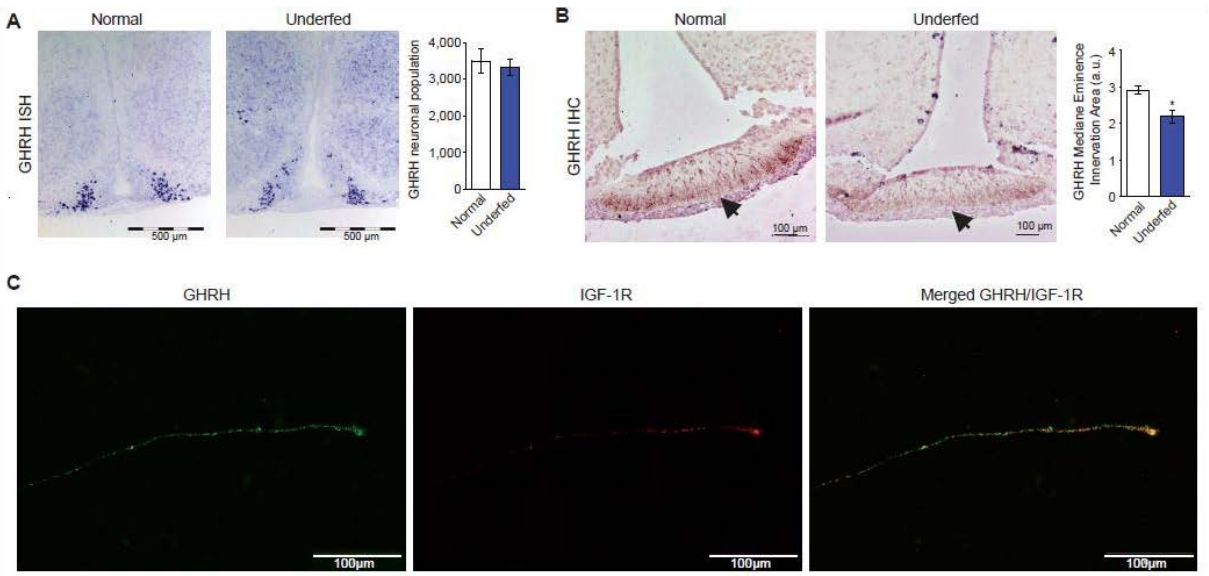

Figure 2: *The development of GHRH neurons is altered in response to underfeeding.*

The numbers of GHRH neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus was estimated by *in situ* hybridization in 10 day-old normally fed or underfed pups (n = 3 per group) (**A**). Concomitantly, the area of innervation of the median eminence (highlighted with the arrow) by axons of GHRH neurons was lower in 10 day-old underfed pups (n = 4 per group) (**B**). Immunohistochemistry from *in vitro* cultured arcuate nucleus explants from 7 day-old normally fed pups show that IGF-1R (in red) is concentrated in the distal part of growing GHRH axon (in green). Merged picture is in the right panel (**C**). Data are presented as the mean ± SEM. All Comparisons were performed using t-test analysis, with *: $p < 0.05$.

from normal litters (Figure 1B). This was associated with lower pituitary growth hormone (GH) mRNA levels (Figure 1C) and permanent pituitary hypoplasia of GH-secreting somatotroph cells from 20 days of age (Figure 1D), as we previously showed in adults (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Kappeler, L. *et al.*, 2009). The low activity of the somatotropic axis in pups from underfed litters suggests alterations in hypothalamus-pituitary development during the early postnatal period (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Kappeler, L. *et al.*, 2009). In agreement, underfed 10 day-old pups displayed decreased circulating levels of IGF-I (Figure 1E) and lower body weight (Normal: 4.98 ± 0.16 *vs* Underfed: 4.59 ± 0.08; n = 23-24; t-test: $p < 0.05$), as well as lower expression of the somatotroph-differentiating factor Pit-1 in the pituitary gland (Figure 1F). The decrease of Pit-1 in the pituitary glands of 10 day-old underfed pups suggests a lack of GHRH signaling, the latter of which is well known to stimulate somatotroph cell proliferation through Pit-1. These findings suggest that reprogramming of the somatotropic axis induced by nutritional restriction may involve GHRH neurons which are still developing during this early postnatal period.

Postnatal underfeeding delays innervation of the median eminence by GHRH neurons.

We first determined whether low IGF-I levels in underfed mice were associated with a loss of GHRH neurons, as IGF-I is very well known for its proliferative and anti-apoptotic actions. The number of GHRH neurons in normally fed and underfed 10 day-old pups was similar by *in situ* hybridization with a GHRH antisense mRNA probe (Figure 2A), suggesting that food restriction does not alter the ontogeny of GHRH neurons. We thus looked for morphological modifications of developing GHRH neurons. We observed a lower anti-GHRH immunoreactive area in the median eminence (the target of GHRH neurons) of 10 day-old underfed mice than in age-matched normally fed mice (Figure 2B). This decrease disappeared by 20 days of age as previously shown (Kappeler, L. *et al.*, 2009). These results suggest that innervation of the median eminence by GHRH neurons may be delayed by under-nutrition, probably due to an alteration of their axonal elongation. This may explain the lower Pit-1 expression levels observed in pituitary glands.

Data from IHC experiments in brain suggest that GHRH neurons of the arcuate nucleus of the hypothalamus innervate the adjacent median eminence by forming a dorso-lateral loop that reaches the median eminence from the posterior part of the brain, making their axons

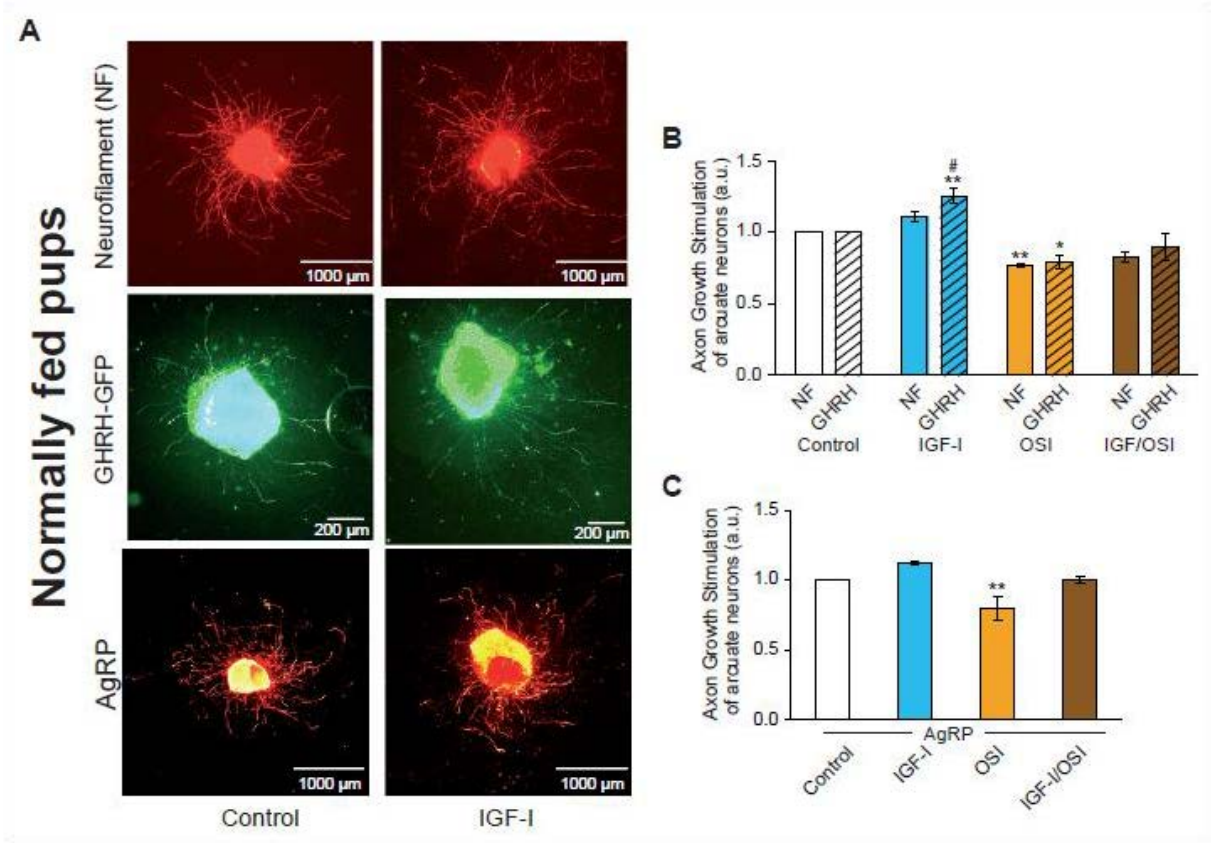

Figure 3: *IGF-I stimulates axon growth of GHRH neurons in arcuate nucleus explants.*

In vitro cultured explants of arcuate nuclei of hypothalamus micro-dissected from one week old normally fed pups are shown for both basal and IGF-I stimulation conditions (**A**), with axons from whole arcuate and GHRH neurons, labeled with by dual-IHC for neurofilament (NF, top panels in red) and eGFP (middle panels in green), respectively. Axons of NPY/AgRP neurons are labeled by IHC for AgRP (bottom panels in orange) (**A**). Quantification of relative axon growth stimulated by IGF-I and/or its inhibitor OSI-906 (OSI) in 24 h for NF (plain bars) and GHRH (dashed bars) (**B**), and for AgRP (**C**). Data are presented as the mean ± SEM. Results were compared using a two-way ANOVA analysis with the Bonferonni post-test (**B**) or a one-way ANOVA analysis with the Newman Keuls post-test (**C**). *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ for each treatment *vs.* Control; #: $p < 0.05$ for GHRH *vs.* NF.

very difficult to follow *in vivo* (E.M. & L.K., personal communication). We thus applied an *ex vivo* approach on isolated and *in vitro* cultivated explants of the arcuate nucleus from normally fed mice to further examine the role of IGF-I in the elongation of axons of these hypothalamic neurons (Lopez-Bendito, G. *et al.*, 2006; Mire, E. *et al.*, 2012). Immunohistochemistry of arcuate explants isolated from the brains of normally fed pups showed that the IGF-1R was concentrated in the distal part of growing GHRH axons (Figure 2C), suggesting that IGF-I may regulate axonal elongation in arcuate neurons.

IGF-I preferentially stimulates axon growth in GHRH arcuate neurons.

In unstimulated (Control condition) explant cultures, the axons of GHRH neurons (labeled with eGFP IHC) were shorter than those of total arcuate neurons labeled with neurofilament (NF) (Control-GHRH: 420 ± 41 µm *vs.* Control-NF: 600 ± 58 µm, n = 5 and 6 experiments per group, respectively, $p < 0.05$).

In explant cultures treated with IGF-I (13.2 nM) for 24 h, axon growth in NF-labeled arcuate neurons was not significantly modified (IGF-I-NF: 662 ± 61 µm *vs.* Control-NF: 600 ± 58 µm, n = 6 experiments per group, 1.11 ± 0.04 fold, NS; Figure 3A, 3B). In contrast, axonal growth of GHRH neurons in the same explants was significantly stimulated by IGF-I (IGF-I-GHRH: 498±68 µm *vs.* Control-GHRH: 420±41 µm, n = 5 experiments per group, 1.25 ± 0.06 fold, $p < 0.01$; Figure 3A, 3B). We used the IGF-1R inhibitor OSI-906 (*Linsitinib*) (Mulvihill, M. J. *et al.*, 2009) alone, or in combination with IGF-I, to confirm that axon growth was specifically stimulated by IGF-I. Indeed, inhibition of the IGF-1R impaired axon growth in GHRH (IGF-I/OSI-GHRH: 0.9 ± 0.10 fold *vs.* IGF-I-GHRH: 1.25 ± 0.06 fold, n = 4-5 experiments per group, $p < 0.0001$; Figure 3B), but curiously also in NF neurons (IGF-I/OSI-NF: 0.83 ± 0.04 fold *vs.* IGF-I-NF: 1.16 ± 0.02 fold, n = 5 experiments per group, $p < 0.0001$). Similar results were obtained using a second IGF-1R inhibitor, *picropodophyllotoxin* (PPP; data not shown). The diminution of axonal growth in NF^+ neurons by OSI may be due to the requirement of IGF-I and insulin signaling for neuron survival (insulin is a crucial component of the B27 supplement of the cell culture media for neuron survival, measured at 58 nM), which also associates with the positive basal axon growth.

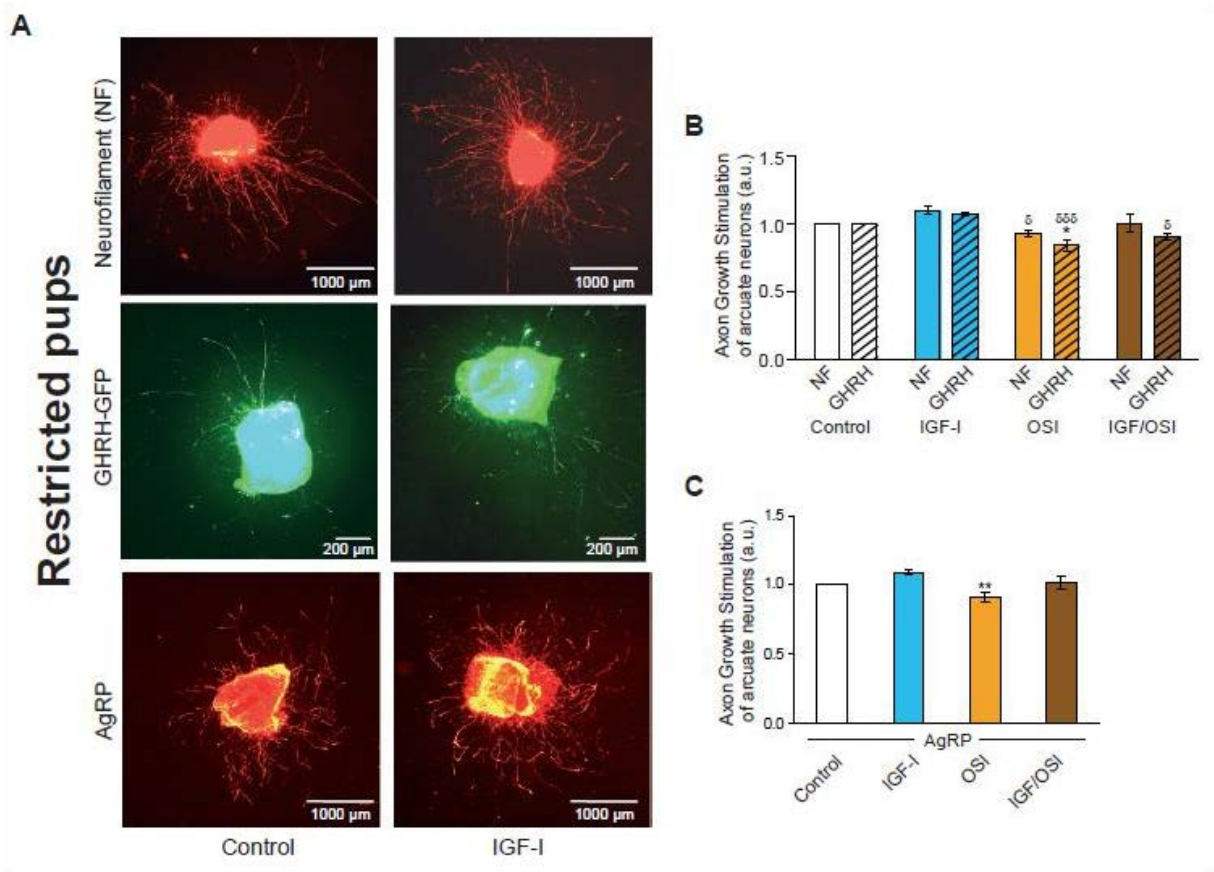

Figure 4: <u>*GHRH neurons from underfed pups do not respond to IGF-I stimulation*</u>.

In vitro cultured explants of arcuate nuclei of hypothalamus micro-dissected from one week old underfed pups are shown for both basal and IGF-I stimulation conditions (**A**), with axons from whole arcuate (NF) and GHRH neurons, labeled by dual-IHC for neurofilament (NF, top panels in red) and eGFP (middle panels in green), respectively. Axons of NPY/AgRP neurons are labeled by IHC for AgRP (bottom panels in orange) (**A**). Quantification of relative axon growth stimulated by IGF-I and/or its inhibitor OSI-906 (OSI) in 24 h for NF (plain bars) and GHRH (dashed bars) (**B**), and for AgRP (**C**). Data are presented as the mean ± SEM. Results were compared using a two-way ANOVA analysis with the Bonferonni post-test (**B**) or a one-way ANOVA analysis with the Newman Keuls post-test (**C**). *: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ for each treatment *vs.* Control; δ: $p < 0.05$, and δδδ: $p < 0.001$ for each treatment *vs.* IGF-I.

The fact that IGF-I significantly stimulated axon growth in GHRH, whereas it did not in NF+ axons, suggests a cell-selective effect. This was further investigated on orexigenic NPY/AgRP neurons, a population previously described to respond to the stimulating effect of leptin during the same period of development (Bouret, S. G. *et al.*, 2004; Bouyer, K. *et al.*, 2013). IGF-I did not significantly stimulate axonal growth of AgRP neurons (AgRP-IGF-I: 559 ± 35µm *vs.* AgRP-Control: 497 ± 34µm; 1.13 ± 0.01 fold, n = 4 experiments per group, NS; Figure 3A, 3C) although OSI906 did inhibit it (Figure 3C). Here again, the diminution of axonal growth in AgRP neurons by OSI may be due to the requirement of IGF-I and insulin signaling for neuron survival that is associated with a basal axon growth, and insulin is a crucial component of the B27 supplement for neuron survival. Altogether, these results suggest that IGF-I preferentially stimulates axon elongation of GHRH neurons of the arcuate nucleus from normally fed pups (IGF-I-GHRH *vs.* IGF-I-NF: $p < 0.01$).

Underfeeding alters the response of GHRH neurons to IGF-I.

The same experiments as those just described for normally fed pups were performed with arcuate nucleus explants isolated from one week old underfed pups to further investigate whether axon elongation of GHRH neurons stimulated by IGF-I may be affected by underfeeding.

In vitro basal axon growth (Control condition) of whole arcuate neurons (NF^+) originating from underfed pups was similar to the growth of those isolated from age-matched normally fed pups (NF-underfed: 553 ± 26 µm *vs.* NF-Normally fed: 600 ± 58, n = 9 and 6 experiments per group, respectively, NS). However, *in vitro* basal axon growth of GHRH neurons from underfed pups was lower than the growth of GHRH neurons isolated from normally fed pups (GHRH-underfed: 296 ± 36 µm *vs*. GHRH-Normally fed: 420 ± 41, n = 7 and 5 experiments per group, respectively, $p < 0.05$).

Stimulation of explants from underfed pups with IGF-I did not significantly induce axon growth in NF^+ arcuate neurons (NF-IGF-I *vs.* NF-Control: 1.10 ± 0.03 fold, n = 4 experiments per group, NS; Figure 4A, 4B), similar to the results for normally fed pups. AgRP neurons from underfed pups also did not respond to IGF-I (AgRP-IGF-I *vs.* AgRP-Control: 1.09 ± 0.02 fold, n = 5 experiments per group, NS; Figure 4A, 4C). However, GHRH

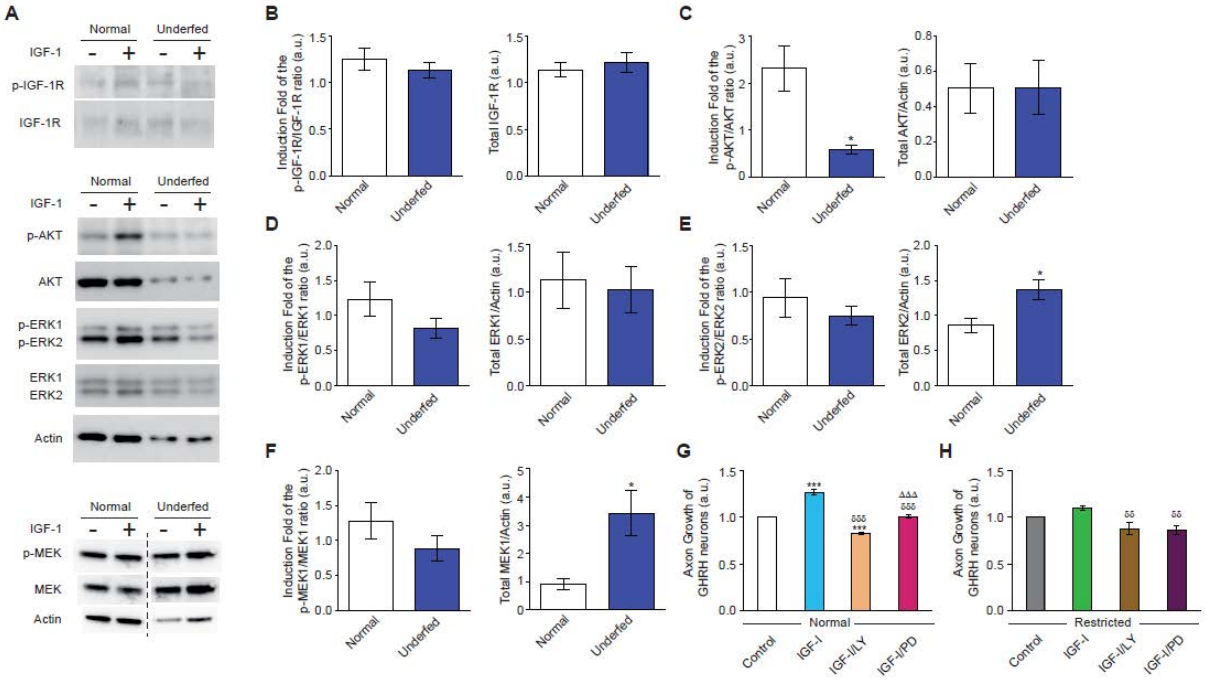

Figure 5: *Alterations of the IGF-IR signaling pathways in arcuate explants from underfed pups*.

Activation of key elements of IGF-1R signaling pathways were measured by Western blot analysis as illustrated with representative blots (**A**). Quantification indicates activation of the IGF-1R (fold induction of the p-IGF-1R/ IGF-1R ratio) by IGF-I stimulation relative to basal levels (left panel), and total IGF-1R protein levels (right panel) in arcuate explants from normally fed and underfed pups (**B**). Similarly, activation of AKT (fold induction of the pAKT/AKT ratio) (**C**), ERK1 (**D**), ERK2 (**E**) and MEK-1 (**F**) are presented (left panels) with their respective total protein levels (right panels) (n = 4-6). *In vitro* explant cultures indicate that specific inhibition of PI3K by LY294002 (LY) and of MEK by PD0325901 (PD) impaired axon growth of GHRH neurons in normally fed (n = 3 per group) (**G**) and underfed pups (n = 6 per group) (**H**). All data are presented as the mean ± SEM with t-test analysis for Western blot analysis and *: $p < 0.05$ for normally fed *vs.* underfed (**V-F**); and one way-ANOVA analysis with the Newman Keuls post-test (**G**, **H**) and *: $p < 0.05$ and ***: $p < 0.001$ for each treatment *vs.* Control; δδ: $p < 0.01$ and δδδ: $p < 0.001$ for each treatment *vs.* IGF-I; Δ Δ Δ: $p < 0.001$ IGF-I/PD *vs.* IGF-I/LY.

neurons harvested from underfed pups did not respond to IGF-I stimulation (GHRH-IGF-I *vs.* GHRH-Control: 1.07 ± 0.01 fold, n = 4 experiments per group, NS; Figure 4A, 4B), in contrast to normally fed pups (Figure 3A, 3B), and were only moderately sensitive to the inhibition of the IGF-1R by OSI (GHRH-OSI *vs.* GHRH-Control: 0.84 ± 0.04 fold, n = 4 experiments per group, $p < 0.05$; Figure 4B). This moderate effect of OSI is probably due to its supplementary inhibitory effect on the insulin signaling pathway that is crucial for neuron survival, as explained above in experiments on normally fed mice. These data suggest that GHRH neurons from underfed pups are insensitive to IGF-I despite normal culture conditions.

Underfeeding alters the IGF-I signaling pathway.

The main elements of the IGF-1R signaling pathway were measured by Western blot analysis, despite the highly limited amount of protein that could be harvested from micro-dissected arcuate nuclei from normally fed or underfed 7 day-old pups. Overall, underfed pups had similar IGF-1R protein levels in their arcuate nucleus as age-matched normally fed pups (Figure 5A and 5B right panel). In addition, a similar induction of IGF-1R activation (p-IGF-1R/IGF-1R ratio) was observed after 15 min of IGF-I stimulation in both underfed and normally fed pups relative to the basal condition (Figure 5A and 5B, left panel). These data suggest that both total IGF-1R levels and its activation were not altered by nutritional restriction.

We thus determined the activation capacities of the two principal signaling pathways activated by the IGF-1R, the PI3K/AKT, and the ERK/MEK pathways. The induction of activated AKT (increase of the p-AKT/AKT ratio) following IGF-I stimulation was much lower in arcuate nuclei isolated from underfed pups than those from normally fed pups (Figure 5A and 5C, left panel). This impairment appeared to involve the activation of AKT as the level of total AKT protein was similar for the two groups (Figure 5A and 5C, right panel). For the ERK/MEK pathway, the induction of activated ERK-1 (increase of the p-ERK-1/ERK-1 ratio) by IGF-I stimulation was not significantly modified in arcuate nuclei harvested from underfed pups relative to normally fed pups (Figure 5A and 5D left panel, NS: $p = 0.126$). Total ERK-1 protein levels were also not modified by nutritional restriction (Figure 5A and 5D, right panel). Induction of activated ERK-2 (increase of the p-ERK-2/ERK-2 ratio) following IGF-1 stimulation was also similar for underfed and normally fed

pups (Figure 5A and 5E, left panel). However, total ERK-2 protein levels were elevated in underfed pups (Figure 5A and 5E, right panel). We observed similar results for the MEK protein as for the ERK-2 protein: a similar response of the underfed and normally fed pups to IGF-I stimulation (Figure 5A and 5F, left panel), and an elevated level of total protein in underfed pups relative to normally fed pups (Figure 5A and 5F, right panel). Altogether, these data suggest that the absence of axon elongation observed for GHRH neurons in underfed pups is associated with impaired activation of the PI3K/AKT signaling pathway, whereas the activation capacity of the ERK/MEK pathway is maintained.

The role of the PI3K/AKT and ERK/MEK signaling pathways in the regulation of axon outgrowth of GHRH neurons were further investigated in arcuate explants from both normally and underfed pups, using specific IGF-1R signaling pathway inhibitors. Normalization respective to the basal conditions of these two sets of experiments required presenting the data on two separate graphs, since basal axon growth in explants from underfed pups is lower than that of normally fed pups. In agreement with the previous *in vitro* results, co-stimulation of arcuate explants from normally fed pups with IGF-I and the specific PI3K inhibitor LY294002 (LY) significantly inhibited IGF-1 mediated axon growth of GHRH neurons relative to both basal conditions (GHRH-IGF/LY *vs.* GHRH-Control: 0.83 ± 0.03 fold; n = 4 experiments per group; $p < 0.001$; Figure 5G) and IGF-I alone ($p < 0.001$; Figure 5G). Treatment of explants with the specific MEK inhibitor PD0325901 (PD) also significantly impaired axon growth of GHRH neurons in response to IGF-I stimulation (GHRH-IGF/PD: *vs.* GHRH-IGF: $p < 0.001$; Figure 5G), but not relative to basal conditions (GHRH-IGF/PD *vs.* GHRH-Control: 1.00 ± 0.03 fold; NS; Figure 5G). Thus, the inhibition of the PI3K signaling pathway (LY) impaired IGF-1-mediated axon growth to a greater extent than inhibition of the MEK pathway (PD) (GHRH-IGF/PD *vs.* GHRH-IGF/LY: $p < 0.001$; Figure 5G). This suggests that IGF-I may stimulate axon growth of GHRH neurons in normally fed pups through the PI3K/AKT and, to a lesser extent, the MEK/ERK signaling pathways.

Axon growth of GHRH neurons in explants from underfed mice was not stimulated by IGF-1 and also tended to be impaired by the inhibition of PI3K relative to basal conditions (GHRH-IGF/LY *vs.* GHRH-Control: 0.88 ± 0.07 fold, n = 6 experiments per group; NS; Figure 5H), and IGF-1 treatment (GHRH-IGF/LY *vs.* GHRH-IGF: $p < 0.01$; Figure 5H). A similar pattern was observed for inhibition of the MEK signaling pathway (GHRH-IGF/PD

vs. GHRH-Control: 0.83 ± 0.06 fold, n = 6 experiments per group; NS; Figure 5H). In contrast to normally fed mice, neurons from underfed pups seemed to be equally sensitive to the inhibition of both the PI3K/AKT and ERK/MEK signaling pathways (underfed: IGF/LY *vs.* IGF/PD: NS; Figure 5H).

Discussion

Here, we show that IGF-I may be involved in axon elongation in a specific subpopulation of hypothalamus neurons. Indeed, the present study indicates that i) IGF-I preferentially stimulates axon growth of GHRH neurons in arcuate nucleus explants of normally fed pups during lactation; ii) IGF-1 stimulation involves the two main signaling pathways PI3K/AKT and ERK/MEK, with greater involvement of the PI3K/AKT pathway; and iii) GHRH neurons harvested from underfed pups and cultivated *in vitro* grow less and become insensitive to the growth promoting effect of IGF-I. This loss of response does not involve an alteration of the IGF-1R or ERK/MEK pathway, but is associated with a defect in AKT activation. Finally, iv) nutritional restriction during lactation, which is associated with permanent growth retardation and later metabolic alterations, is associated with lower IGF-I plasma levels and a change of the body growth trajectory. It is preceded by delayed axon elongation of GHRH neurons during the first 10 days of life, a critical developmental window. These physiological outcomes are in agreement with the tight control of IGF-I levels by nutritional supplies and its specific role in GHRH neuronal development.

Prior studies have shown that they are sex and age differences in GHRH neuron development (McArthur, S. *et al.*, 2011). Our explant experiments were carried out during a period in which there are sex-dependent differences concerning GHRH neurons in the arcuate. Indeed, it was reported that GHRH neurons increase in both sexes during the P1-P10 period, males having more GHRH neurons than females. After P20, the number of GHRH neurons stabilized in males, and continued to increase in females (McArthur, S. *et al.*, 2011). Our study showed an identical number of GHRH neurons in males at P10 (figure 2A) and highlights the positive effect of IGF-I on GHRH neuron axonal elongation at P7.

IGF-I is well known to improve proliferation and cell survival in virtually all cellular models tested. High IGF-I levels in the brain are associated with increased length and

complexity of neuronal dendritic arborization (Kim, Bhumsoo *et al.*, 1997; Niblock, M. M. *et al.*, 2000; Jaworski, J. *et al.*, 2005). It is also strongly associated with axonal determination during the early phase of neuronal differentiation through plasmalemmal expansion (Pfenninger, K. H. *et al.*, 2003) induced by the IGF-1Rgc isoform (Laurino, L. *et al.*, 2005; Sosa, L. *et al.*, 2006). During the later phase of neuronal differentiation and axon elongation, IGF-I induces axonal outgrowth in some neuronal subpopulations. However, this effect is not ubiquitous. Indeed, IGF-1R signaling is associated with axon elongation of corticospinal motor neurons during development (Ozdinler, P. H. *et al.*, 2006), but not in adulthood (Hollis, E. R., 2nd *et al.*, 2009). In contrast, axon regeneration of raphespinal and cerulospinal axons after a spinal cord injury in adults is stimulated by IGF-I (Hollis, E. R., 2nd *et al.*, 2009), despite that corticospinal motor neurons are in close proximity to the raphespinal and cerulospinal neurons (Hollis, E. R., 2nd *et al.*, 2009). These data suggest that corticospinal motor neurons specifically lose their capacity to respond to IGF-I in adult animals. IGF-1 also does not stimulate axon elongation in the developing lateral olfactory neuron model, but appears to have chemotactic effects (Scolnick, J. A. *et al.*, 2008). These data suggest that IGF-I may stimulate axon elongation in a cell specific manner and a similar mechanism may operate in the hypothalamus of mice during the early postnatal period. Indeed, IGF-I appeared to preferentially stimulate axon elongation of the GHRH neuronal subpopulation, highlighting the complexity of the role of IGF-I in neuronal development.

The PI3K/AKT pathway is strongly implicated in the stimulation of axonal outgrowth in normally fed pups, and underfeeding is associated with impaired AKT stimulation. The specific role of the two IGF-1R signaling pathways has been studied in different models of neuronal cultures. Notably, the stimulation of axonal outgrowth by the PI3K/AKT signaling pathway has been associated with perikaryon-independent plasmalemmal expansion in embryonic pyramidal neurons of the hippocampus (Pfenninger, K. H. *et al.*, 2003; Laurino, L. *et al.*, 2005; Bernis, M. E. *et al.*, 2013). In contrast, the stimulation of axonal outgrowth in sensory neurons by the ERK/MEK signaling pathway has been associated with both local protein synthesis and the regulation of gene transcription (Lonze, B. E. *et al.*, 2002; Liu, C. M. *et al.*, 2012). Other studies suggest that both the PI3K/AKT and ERK/MEK signaling pathways present a potential cell-type specific effect. Indeed, the ERK/MEK signaling pathway has been associated with increased axon length in dorsal root ganglion neurons, whereas the PI3K/AKT pathway was associated with axon caliber and branching (Markus, A. *et al.*, 2002). Thus, the increase of ERK2 and MEK protein levels in the arcuate of underfed

pups may indicate compensation for the altered AKT activation. Further studies will be required to determine the role of the AKT signaling pathway in GHRH axon growth in more details, and particularly if underfeeding is associated with alterations of plasmalemmal expansion of GHRH neurons.

Our present study shows that nutrition plays a crucial role in the development of the somatotropic axis of the hypothalamus-pituitary complex. These data are in agreement with other studies that link nutrition during this critical period and the programming of various hypothalamic neuronal network, notably those of subpopulations that regulate food intake and metabolism in adults, and of the reproductive axis (Bouret, S. G. *et al.*, 2004; Caron, E. *et al.*, 2012; Bouyer, K. *et al.*, 2013; Vogt, M. C. *et al.*, 2014). In conclusion, axonal growth of GHRH neurons appears to be a crucial physiological mechanism, controlled by IGF-I, which programs the subsequent production of GH by the pituitary gland, ultimately coordinating organ growth in an endocrine-dependent manner in response to environmental cues during the critical window of the early postnatal period. This mechanism is important from the perspective of the predictive adaptive response hypothesis within the DoHAD, because adult size determines the daily metabolic needs that must be adapted to a predicted environment to optimize survival capacities and reproduction (Bateson, P. *et al.*, 2004; Gluckman, P. D. *et al.*, 2004; McMillen, I. C. *et al.*, 2005). Ultimately, this mechanism, accompanied by changes of perinatal IGF-I levels, may partially program ageing and longevity which are also partially controlled in mammals by GH/IGF-I signaling in adulthood (Holzenberger, M. *et al.*, 2003; Kappeler, L. *et al.*, 2008; Kappeler, L. *et al.*, 2009; Sun, L. *et al.*, 2009).

Acknowledgments

The authors wish to thank Laurence Perrin for her technical assistance, and Alex Edelman & associates for language editing.

References

Adamo, M., M. K. Raizada and D. LeRoith (1989). "Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system." Mol Neurobiol **3**(1-2): 71-100.

Balthasar, N., P. F. Mery, C. B. Magoulas, K. E. Mathers, A. Martin, P. Mollard and I. C. Robinson (2003). "Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in GHRH-enhanced green fluorescent protein transgenic mice: a ventral hypothalamic network." Endocrinology **144**(6): 2728-2740.

Bateson, P., D. Barker, T. Clutton-Brock, D. Deb, B. D'Udine, R. A. Foley, P. Gluckman, K. Godfrey, T. Kirkwood, M. M. Lahr, J. McNamara, N. B. Metcalfe, P. Monaghan, H. G. Spencer and S. E. Sultan (2004). "Developmental plasticity and human health." Nature **430**(6998): 419-421.

Bernis, M. E., M. Oksdath, S. Dupraz, A. Nieto Guil, M. M. Fernandez, E. L. Malchiodi, S. B. Rosso and S. Quiroga (2013). "Wingless-type family member 3A triggers neuronal polarization via cross-activation of the insulin-like growth factor-1 receptor pathway." Front Cell Neurosci **7**: 194.

Bouret, S. G., S. J. Draper and R. B. Simerly (2004). "Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding." Science **304**(5667): 108-110.

Bouyer, K. and R. B. Simerly (2013). "Neonatal leptin exposure specifies innervation of presympathetic hypothalamic neurons and improves the metabolic status of leptin-deficient mice." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **33**(2): 840-851.

Caron, E., P. Ciofi, V. Prevot and S. G. Bouret (2012). "Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function." J Neurosci **32**(33): 11486-11494.

Fernandez, A. M. and I. Torres-Aleman (2012). "The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain." Nature reviews. Neuroscience **13**(4): 225-239.

Fiorotto, M. L., D. G. Burrin, M. Perez and P. J. Reeds (1991). "Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters." Am J Physiol **260**(6 Pt 2): R1104-1113.

Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004). "Living with the past: evolution, development, and patterns of disease." Science **305**(5691): 1733-1736.

Hales, C. N. and D. J. Barker (2001). "The thrifty phenotype hypothesis." British medical bulletin **60**: 5-20.

Hollis, E. R., 2nd, P. Lu, A. Blesch and M. H. Tuszynski (2009). "IGF-I gene delivery promotes corticospinal neuronal survival but not regeneration after adult CNS injury." Experimental neurology **215**(1): 53-59.

Holzenberger, M., J. Dupont, B. Ducos, P. Leneuve, A. Geloen, P. C. Even, P. Cervera and Y. Le Bouc (2003). "IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice." Nature **421**(6919): 182-187.

Jaworski, J., S. Spangler, D. P. Seeburg, C. C. Hoogenraad and M. Sheng (2005). "Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway." J Neurosci **25**(49): 11300-11312.

Kappeler, L., C. De Magalhaes Filho, J. Dupont, P. Leneuve, P. Cervera, L. Perin, C. Loudes, A. Blaise, R. Klein, J. Epelbaum, Y. Le Bouc and M. Holzenberger (2008). "Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism." PLoS Biol **6**(10): e254.

Kappeler, L., C. De Magalhaes Filho, P. Leneuve, J. Xu, N. Brunel, C. Chatziantoniou, Y. Le Bouc and M. Holzenberger (2009). "Early postnatal nutrition determines somatotropic function in mice." Endocrinology **150**(1): 314-323.

Kim, B., P. S. Leventhal, A. R. Saltiel and E. L. Feldman (1997). "Insulin-like Growth Factor-I-mediated Neurite Outgrowth in Vitro Requires Mitogen-activated Protein Kinase Activation." Journal of Biological Chemistry **272**(34): 21268-21273.

Laurino, L., X. X. Wang, B. A. de la Houssaye, L. Sosa, S. Dupraz, A. Caceres, K. H. Pfenninger and S. Quiroga (2005). "PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone." Journal of cell science **118**(Pt 16): 3653-3662.

Liu, C. M., E. M. Hur and F. Q. Zhou (2012). "Coordinating Gene Expression and Axon Assembly to Control Axon Growth: Potential Role of GSK3 Signaling." Frontiers in molecular neuroscience **5**: 3.

Lonze, B. E., A. Riccio, S. Cohen and D. D. Ginty (2002). "Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB." Neuron **34**(3): 371-385.

Lopez-Bendito, G., A. Cautinat, J. A. Sanchez, F. Bielle, N. Flames, A. N. Garratt, D. A. Talmage, L. W. Role, P. Charnay, O. Marin and S. Garel (2006). "Tangential neuronal

migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation." Cell **125**(1): 127-142.

Markus, A., J. Zhong and W. D. Snider (2002). "Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth." Neuron **35**(1): 65-76.

McArthur, S., I. C. Robinson and G. E. Gillies (2011). "Novel ontogenetic patterns of sexual differentiation in arcuate nucleus GHRH neurons revealed in GHRH-enhanced green fluorescent protein transgenic mice." Endocrinology **152**(2): 607-617.

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

Mire, E., C. Mezzera, E. Leyva-Diaz, A. V. Paternain, P. Squarzoni, L. Bluy, M. Castillo-Paterna, M. J. Lopez, S. Peregrin, M. Tessier-Lavigne, S. Garel, J. Galceran, J. Lerma and G. Lopez-Bendito (2012). "Spontaneous activity regulates Robo1 transcription to mediate a switch in thalamocortical axon growth." Nat Neurosci **15**(8): 1134-1143.

Mire, E., N. Thomasset, L. B. Jakeman and G. Rougon (2008). "Modulating Sema3A signal with a L1 mimetic peptide is not sufficient to promote motor recovery and axon regeneration after spinal cord injury." Mol Cell Neurosci **37**(2): 222-235.

Mulvihill, M. J., A. Cooke, M. Rosenfeld-Franklin, E. Buck, K. Foreman, D. Landfair, M. O'Connor, C. Pirritt, Y. Sun, Y. Yao, L. D. Arnold, N. W. Gibson and Q. S. Ji (2009). "Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor." Future Med Chem **1**(6): 1153-1171.

Niblock, M. M., J. K. Brunso-Bechtold and D. R. Riddle (2000). "Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(11): 4165-4176.

Nieto-Estevez, V., C. Defterali and C. Vicario-Abejon (2016). "IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain." Frontiers in neuroscience **10**: 52.

Ong, K. K., P. Emmett, K. Northstone, J. Golding, I. Rogers, A. R. Ness, J. C. Wells and D. B. Dunger (2009). "Infancy weight gain predicts childhood body fat and age at menarche in girls." J Clin Endocrinol Metab **94**(5): 1527-1532.

Ozdinler, P. H. and J. D. Macklis (2006). "IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons." Nature neuroscience **9**(11): 1371-1381.

Pfenninger, K. H., L. Laurino, D. Peretti, X. Wang, S. Rosso, G. Morfini, A. Caceres and S. Quiroga (2003). "Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone." Journal of cell science **116**(Pt 7): 1209-1217.

Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-671.

Scolnick, J. A., K. Cui, C. D. Duggan, S. Xuan, X. B. Yuan, A. Efstratiadis and J. Ngai (2008). "Role of IGF signaling in olfactory sensory map formation and axon guidance." Neuron **57**(6): 847-857.

Solloso, A., L. Barreiro, R. Seoane, E. Nogueira, C. Canibano, C. V. Alvarez, J. Zalvide, C. Dieguez and C. M. Pombo (2008). "GHRH proliferative action on somatotrophs is cell-type specific and dependent on Pit-1/GHF-1 expression." J Cell Physiol **215**(1): 140-150.

Sosa, L., S. Dupraz, L. Laurino, F. Bollati, M. Bisbal, A. Caceres, K. H. Pfenninger and S. Quiroga (2006). "IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity." Nature neuroscience **9**(8): 993-995.

Sun, L., A. A. Sadighi Akha, R. A. Miller and J. M. Harper (2009). "Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(7): 711-722.

Thissen, J. P., J. M. Ketelslegers and L. E. Underwood (1994). "Nutritional regulation of the insulin-like growth factors." Endocr Rev **15**(1): 80-101.

Vogt, M. C., L. Paeger, S. Hess, S. M. Steculorum, M. Awazawa, B. Hampel, S. Neupert, H. T. Nicholls, J. Mauer, A. C. Hausen, R. Predel, P. Kloppenburg, T. L. Horvath and J. C. Bruning (2014). "Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding." Cell **156**(3): 495-509.

Weaver, I. C., I. C. Hellstrom, S. E. Brown, S. D. Andrews, S. Dymov, J. Diorio, T. Y. Zhang, M. Szyf and M. J. Meaney (2014). "The methylated-DNA binding protein MBD2 enhances NGFI-A (egr-1)-mediated transcriptional activation of the glucocorticoid receptor." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1652).

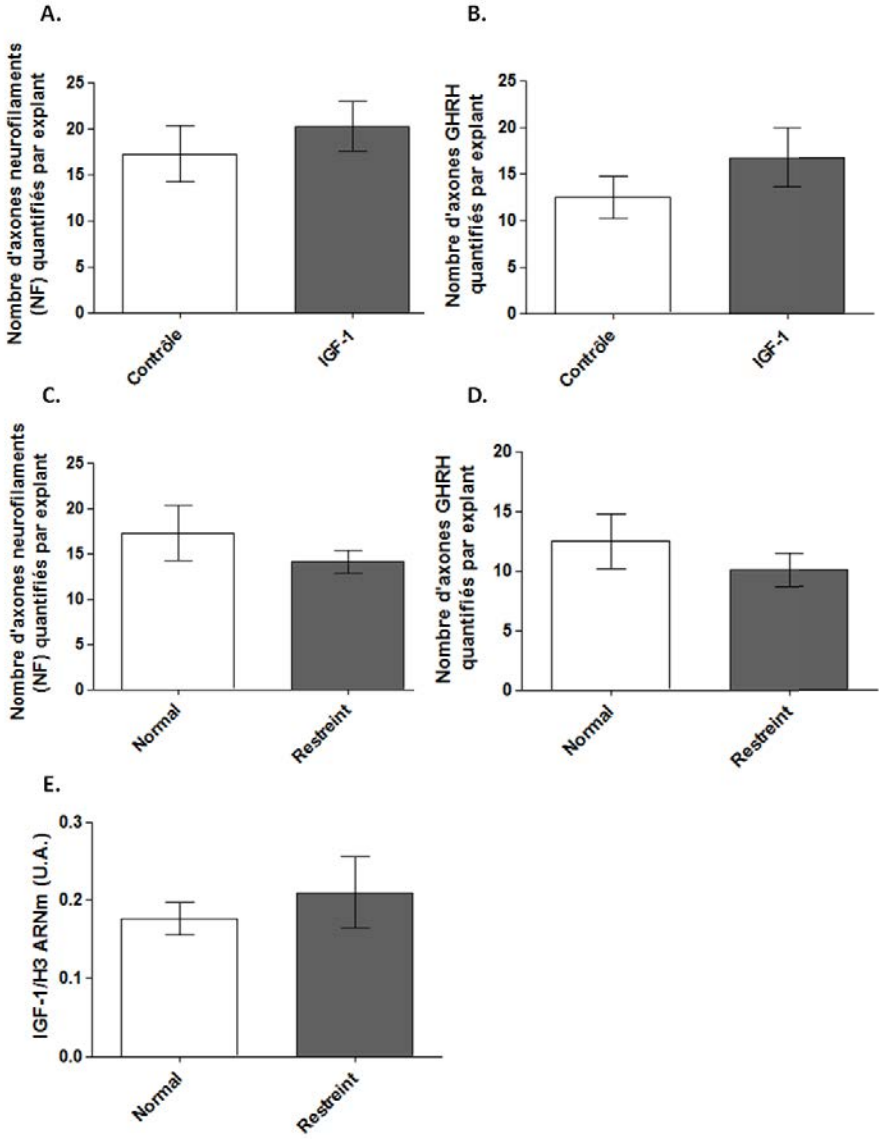

Figure 29 : Rôle de l'IGF-1 sur le nombre d'axones quantifiés par explant dans le puits contrôle ou supplémenté en IGF-1 pour le marquage neurofilament **(A.)** ou GHRH **(B.)** chez les souris normalement nourries. Nombre d'axones quantifiés par explant dans le puits contrôle chez des souriceaux normalement nourris ou restreints pour le marquage neurofilament **(C.)** ou GHRH **(D.)**, n=4-8 puits quantifiés par groupe**.** Expression d'IGF-1 dans le noyau arqué de souriceaux mâles âgés de 10 jours normalement nourris (Normal) ou restreints au cours de la lactation (Restreint) en période de lactation, normalisé par le gène H3 (Histone 3) **(E.)**, moyenne ± SEM, n=7-8 individus par groupe, Statistique : Test de Student, non significatif.

Résultats & Discussion :

La restriction induit chez des souris C57 Bl/6J une diminution des taux circulants en IGF-1 ainsi qu'une hypoplasie hypophysaire en cellules somatotropes à 20 jours de vie. Cette hypoplasie est associée à une diminution de l'expression de la GH hypophysaire à 90 jours de vie. Ces résultats sont corrélés avec une diminution du facteur de prolifération et de différenciation des cellules somatotropes PIT1 à 10 jours de vie. Les résultats de cette étude montrent globalement un phénotype similaire aux souris F1 C57 Bl/6J x 129/SvPas quant à la programmation de l'axe somatotrope par la restriction alimentaire en période postnatale précoce (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Nos résultats suggèrent là aussi une altération au niveau des neurones à GHRH. L'histologie de souriceaux C57 Bl/6J âgés de 10 jours a permis de mettre en évidence une diminution de l'aire d'innervation de l'éminence médiane par les axones des neurones à GHRH chez les souris restreintes.

L'IGF-1 ayant été impliqué dans la neurogenèse du cerveau et notamment dans la croissance axonale de certaines sous-populations neuronales (Scolnick, J. A. *et al.*, 2008; Hollis, E. R., 2nd *et al.*, 2009), nous avons étudié le rôle potentiel de l'IGF-1 sur l'ontogénie et la survie cellulaire, ainsi que sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué. Pour cela, nous avons réalisé des cultures d'explants (Lopez-Bendito, G. *et al.*, 2006; Mire, E. *et al.*, 2012). Les explants ont été traités avec de l'IGF-1 pendant 24H avant d'être analysés. Globalement, les résultats indiquent que l'IGF-1 stimule préférentiellement la croissance axonale des neurones à GHRH, de manière dépendante du récepteur IGF-1R et des deux voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK. Cependant, les neurones à GHRH issus de souriceaux restreints ne sont plus sensibles à la stimulation de la croissance axonale par l'IGF-1.

Concernant l'ontogénie et la survie neuronale, nos résultats indiquent que la restriction en période de lactation n'altère pas l'ontogénie des neurones à GHRH (Hybridation *In Situ*). Cet effet semblait en effet peu probable étant donné que le retard d'innervation au niveau de l'éminence médiane était transitoire : on ne distingue plus de différence à partir de P20 chez les souris *Igf-1r*$^{+/-}$ spécifiquement au niveau du cerveau (Kappeler, L. données non publiées). De plus, dans nos cultures *in vitro* d'explants de noyau arqué, le nombre d'axones quantifiés par explant reste inchangé lors d'une stimulation IGF-1 chez les souriceaux normalement nourris, pour les neurones du noyau arqué (neurofilament) et les neurones à GHRH **(Figure 29 A et B)** (NF_Contrôle : 17±4 *vs* NF_IGF-1 : 20±3, n=4, NS, GHRH_Contrôle : 13±3 *vs*

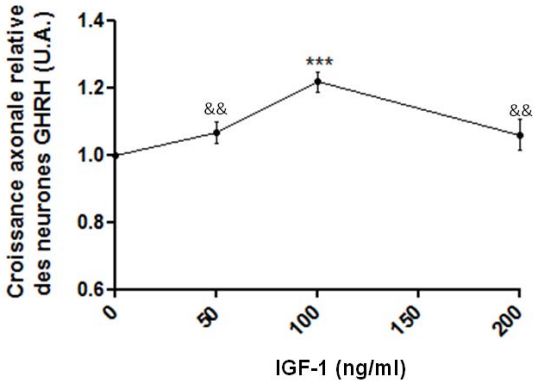

Figure 30 : Réponse des neurones à GHRH issus de souris normalement nourries à des doses croissantes d'IGF-1, en milieu supplémenté en B27 avec insuline. Croissance axonale des neurones à GHRH pour des doses croissantes d'IGF-1 de 50, 100 et 200ng/ml. Moyenne ± SEM, n=6-7 par dose. Statistiques : One Way-Anova et test post-hoc Newman-Keuls, avec ***=p<0.001 X *vs* contrôle, &&=p<0.01 X *vs* IGF-100ng/ml.

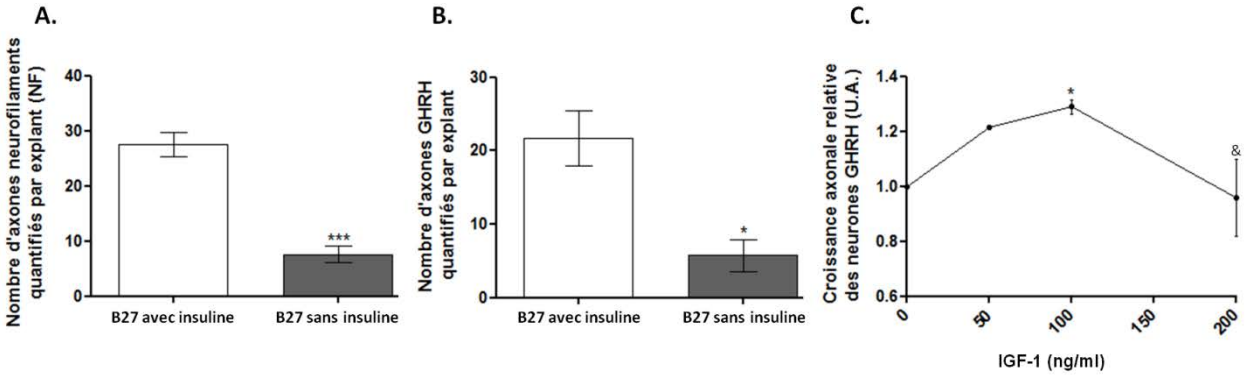

Figure 31 : Implication de l'insuline présente dans le B27 sur le nombre d'axones quantifiés par explant dans un milieu supplémenté en B27 avec insuline ou en B27 sans insuline pour le marquage neurofilament **(A.)** et les axones GHRH **(B.)**. Moyenne ± SEM, n=4-7 par groupe. Statistique : Test de Student, avec *=p<0.05. Croissance axonale relative des neurones à GHRH dans un milieu supplémenté en B27 sans insuline et stimulés avec des doses croissantes d'IGF-1 **(C.)**, n=2-4 par groupe. Statistiques : One Way-Anova et test post-hoc Newman-Keuls, avec *=p<0.05 X *vs* contrôle, &=p<0.05 X *vs* IGF-1 100ng/ml.

GHRH_IGF-1 : 17±4, n=4, NS). Le nombre d'axones quantifié est également inchangé entre les souris normalement nourries et les restreintes **(Figure 29 C et D)** (NF_Normal : 17±4 *vs* NF_Restreint : 14±1, n=4-8, NS, GHRH_Normal : 12±3 *vs* GHRH_Restreint : 10±2, n=5, NS). Il est à noter que l'expression d'IGF-1 au niveau de l'hypothalamus est similaire dans les deux groupes **(Figure 29 E)**. Cette expression locale pourrait expliquer l'absence d'altération de l'ontogénie des neurones à GHRH observée chez les souriceaux restreints. Les effets de l'IGF-1 sur la croissance axonale serait alors majoritairement permis par l'IGF-1 endocrine.

Concernant la régulation de la croissance axonale, outre les résultats présentés dans le manuscrit, nous avons étudié si la croissance des neurones à GHRH chez les souriceaux normalement nourris répondait à l'IGF-1 de manière dose dépendante. La stimulation de la croissance axonale des neurones à GHRH augmente entre 0 et 100ng/ml d'IGF-1. De manière surprenante, on observe cependant une diminution de la croissance axonale des neurones à GHRH pour une concentration de 200ng/ml d'IGF-1 **(Figure 30)** (GHRH_Contrôle *vs* GHRH_IGF-1 100ng/ml : 1.22±0.03, n=6-7, $p<0.001$, GHRH_Contrôle *vs* GHRH_IGF-1 200ng/ml : 1.06±0.05, n=6, NS). Cet effet a également été observé dans d'autres études pour des doses élevées (O'Kusky, J. R. *et al.*, 2003; Scolnick, J. A. *et al.*, 2008). On peut supposer que les boucles de rétrocontrôles négatives présentes dans ou entre les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK diminuent l'action de l'IGF-1. En effet, il a été montré que ERK pouvait inhiber l'activation de la PI3K (Mendoza, M. C. *et al.*, 2011). De même, une forte concentration d'IGF-1 a été associée à une inhibition de RAF dans la voie des MAPK, probablement *via* la stimulation d'AKT (Moelling, K. *et al.*, 2002). De plus, il est à noter que l'IGF-1 peut également stimuler la synaptogenèse (O'Kusky, J. R. *et al.*, 2003). On peut donc aussi supposer qu'une forte concentration d'IGF-1 pourrait stimuler la synaptogenèse des neurones à GHRH, ce qui stopperait leur croissance axonale. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par un co-marquage immunohistochimique des neurones GHRH avec des marqueurs de la synaptogenèse comme la synaptophysine dans les puits traités par 200ng/ml d'IGF-1.

De manière importante, il est à noter que les cultures d'explants ont été réalisées dans un milieu supplémenté en B27 qui contient 58nM d'insuline selon nos mesures par immuno-dosage **(Figure 31).** L'insuline activant les mêmes voies de signalisation que l'IGF-1, nous avons voulu vérifier que l'insuline n'interférait pas dans nos résultats. L'utilisation du

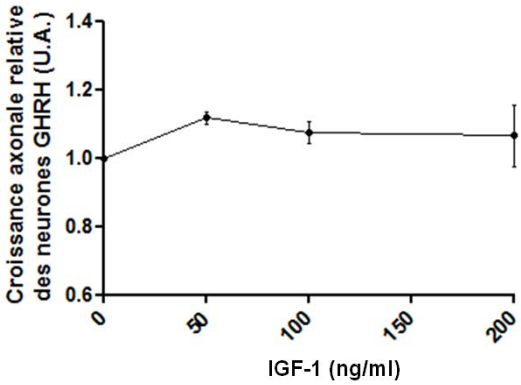

Figure 32 : Réponse des neurones à GHRH issus de souris restreintes à des doses croissante d'IGF-1. Croissance axonale relative dans un milieu supplémenté en B27 avec insuline, n=5 par dose. Moyenne ± SEM. Statistiques : Way-Anova et test post-hoc Newman-Keuls.

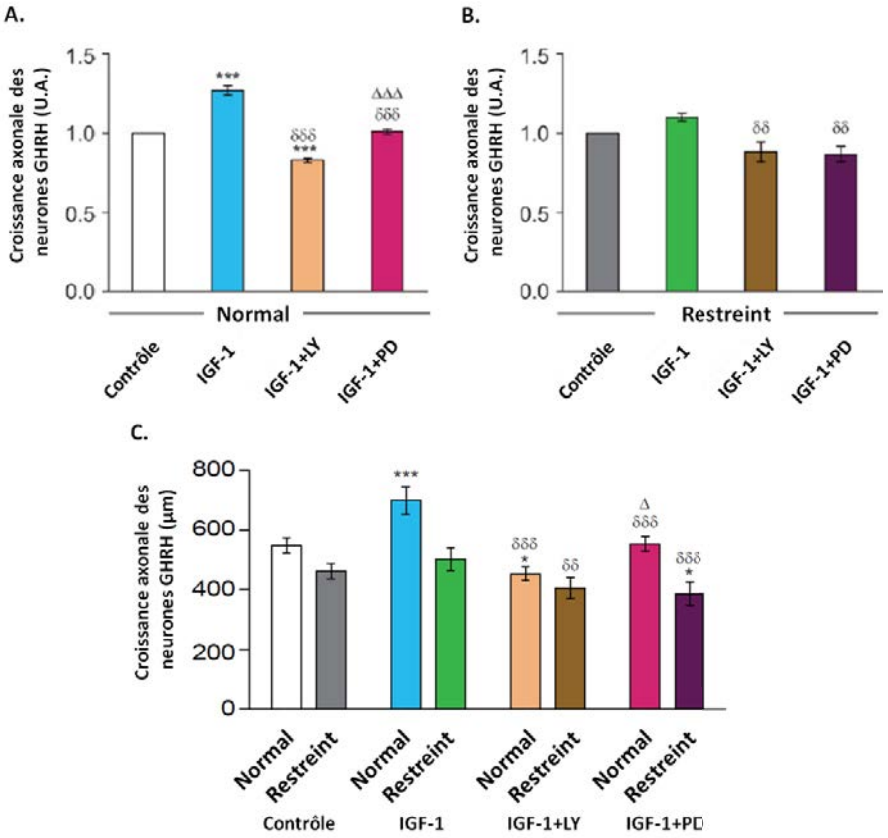

Figure 33 : Réponse des neurones à GHRH à l'inhibition des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK sur les cultures d'explants de noyaux arqués de souriceaux âgés de 7 jours. Croissance axonale **relative** des neurones à GHRH chez les souriceaux normalement nourris **(A.)** ou restreints **(B).** Croissance axonale en **µm** des neurones à GHRH **(C.)**. L'inhibition de PI3K par LY294002 (LY) et de MEK par PD0325901 (PD) altère la croissance axonale des neurones à GHRH. Moyenne ± SEM, n=3-6 par groupe. Statistiques : One Way Anova et test post-hoc Newman Keuls (A. et B.), Two Way Anova, Bonferonni post-test (C.), avec *: $p<0.05$ et ***: $p<0.001$ pour X *vs.* Contrôle; δδ: $p<0.01$ et δδδ: $p<0.001$ pour X *vs.* IGF-I ; Δ: $p<0.05$ IGF-I/PD *vs.* IGF-I/LY.

complément B27 sans insuline dans nos milieux de culture confirme que l'insuline est cruciale pour la survie des neurones **(Figure 31 A et B)** (Rhee, Y. H. *et al.*, 2013). En effet, le nombre d'axones quantifié est fortement diminué dans le cas d'un milieu sans insuline. Nous avons ensuite refait les études de stimulation de la croissance axonale des neurones à GHRH par des doses croissantes d'IGF-1 dans le milieu supplémenté en B27 sans insuline **(Figure 31 C)**. Les analyses de doses réponses à l'IGF-1 réalisées dans un milieu sans insuline donnent des résultats similaires aux analyses réalisées dans un milieu supplémenté en insuline bien que le nombre de neurones survivants était fortement diminué. Ainsi, l'insuline présente dans le B27 permettrait de favoriser la survie des neurones mais n'impacterait pas la croissance des neurones à GHRH en réponse à l'IGF-1 (stimulation relative avec 100ng/ml d'IGF-1 de 1.22±0.03 dans un milieu supplémenté en B27 avec insuline, n=7, et de 1.29±0.03 dans un milieu supplémenté en B27 sans insuline, n=3).

D'autre part, cet article montre également qu'une altération de la nutrition au cours de la lactation engendre une perte de réponse des neurones à GHRH à la stimulation de la croissance axonale par l'IGF-1. Nos expériences de doses réponses sur des explants issus de souriceaux restreints semblent indiquer que cette résistance persiste quelle que soit la dose d'IGF-1 utilisée **(Figure 32)**. Ces résultats suggèrent que les neurones GHRH ne sont pas moins sensibles mais sont bien résistants à l'action de l'IGF-1. Cette absence de réponse des neurones à GHRH semble être due à une altération des capacités de phosphorylation d'AKT. Ceci semble spécifique puisque les capacités de phosphorylation d'IGF-1R et d'ERK et MEK sont inchangées. Cependant, on observe une augmentation des taux protéiques d'ERK et MEK, ce qui pourrait suggérer une quantité absolue de protéines activées augmentée et donc une tentative de compensation. En ce sens, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques sur nos cultures d'explants nous indique que l'inhibition de la voie MAPK par l'inhibiteur PD0325901 a un effet plus important chez les souris restreintes que chez les souris normalement nourries (Normal_IGF/LY *vs* Normal_IGF/PD, $p<0.05$, n=3 par groupe, Restreint_IGF/LY *vs* Restreint_IGF/PD, NS, n=6 par groupe) **(Figure 33)**. Afin d'illustrer au mieux cette observation les données brutes en µm des souris normalement nourries ou restreintes ont été mises sur le même graphique.

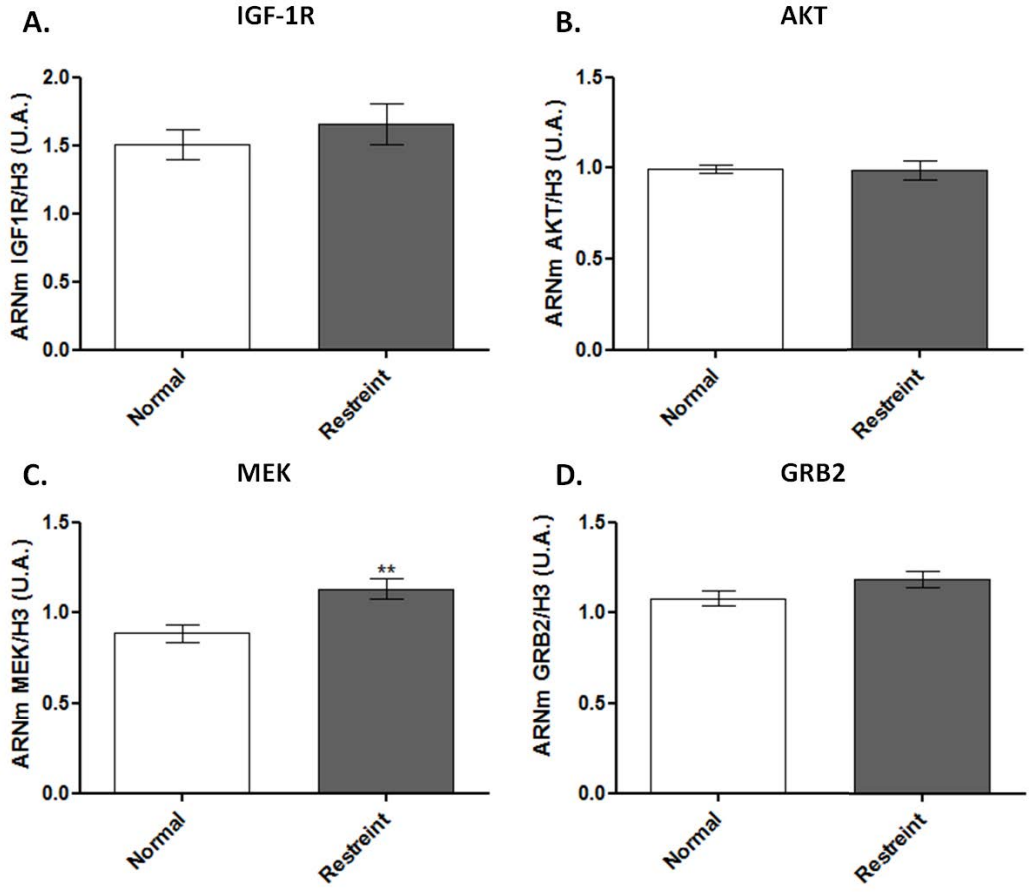

Figure 34 : Expression des différents facteurs des voies de signalisation de l'IGF-1 chez des souriceaux normalement nourris ou restreints en période de lactation. Expression d'IGF-1R **(A.)**, expression d'AKT **(B.)**, expression de MEK **(C.)**, et expression de GRB2 **(D.)**. Les taux d'expression sont normalisés par rapport au gène de ménage H3. Moyenne ± SEM, Statistique : Test de Student, avec **=p<0.01 Restreint *vs* Normal.

Les mesures protéiques obtenues par western blot sur les explants ont été confortées au niveau des ARNm sur l'hypothalamus des souriceaux âgés de 10 jours. En effet, l'expression d'IGF-1R et d'AKT restent inchangée lors d'une restriction **(Figure 34 A et B)**, alors que l'expression de MEK est augmentée **(Figure 34 C)**. De plus, nous avons pu compléter l'étude en analysant GRB2 (*growth factor receptor bound protein 2*), situé en amont de la voie MAPK, qui reste inchangé **(Figure 34 D)**. L'absence de variation de GRB2 est en faveur de l'absence de variation des capacités de phosphorylation de la voie MAPK.

Plusieurs études ont analysé le rôle des deux voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK sur la maturation neuronale. Ainsi, la voie PI3K/AKT est connue pour être impliquée dans la polarisation de l'axone, dans les étapes précoces de la maturation neuronale, ainsi que dans l'expansion de la membrane plasmique. Ce dernier effet serait régulé de manière locale, indépendamment du périkaryon (Pfenninger, K. H. *et al.*, 2003; Laurino, L. *et al.*, 2005; Pfenninger, K. H., 2009; Diez, H. *et al.*, 2012; Bernis, M. E. *et al.*, 2013). La stimulation de la croissance axonale par la voie des MAPK a quant à elle été associée à la stimulation au niveau du périkaryon de la transcription des gènes et de la synthèse protéique (Lonze, B. E. *et al.*, 2002; Campbell, D. S. *et al.*, 2003; Liu, C. M. *et al.*, 2012). Cependant, d'autres études suggèrent que les effets induits par ces deux voies de signalisation diffèrent selon le type cellulaire. En effet, la voie des MAPK semble permettre la croissance axonale dans les neurones sensitifs, tandis que la voie PI3K/AKT serait plutôt impliquée dans l'augmentation du diamètre de ces axones (Markus, A. *et al.*, 2002; Markus, A. *et al.*, 2002). Enfin, certaines études suggèrent également des interactions entre les deux voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK (Mendoza, M. C. *et al.*, 2011). Ainsi, on peut supposer que l'augmentation protéique d'ERK2 et MEK dans le noyau arqué des souris restreintes au cours de la lactation concorderait avec une tentative de compensation de l'altération de la voie PI3K/AKT.

En conclusion, j'ai pu montrer chez la souris que dans le cadre d'une alimentation normale au cours de la lactation, l'IGF-1 stimule la croissance axonale des neurones à GHRH du noyau arqué par l'intermédiaire de l'IGF-1R, et des voies PI3K/AKT et MAPK. Cette stimulation permet aux axones des neurones à GHRH d'innerver l'éminence médiane plus rapidement, ce qui assure une fenêtre de stimulation de la prolifération et de la différenciation plus longue des cellules somatotropes hypophysaires. De plus, j'ai pu montrer que la

restriction alimentaire limite la croissance axonale des neurones à GHRH et est associée à une résistance de ces derniers à une stimulation ultérieure par l'IGF-1. Cette résistance qui perdure *in vitro* dans des conditions contrôlées implique la voie PI3K/AKT.

Etude de l'impact de l'alimentation postnatale précoce sur la mise en place de l'axe somatotrope

II

Impact de l'insuline et de la leptine sur la croissance axonale des neurones à GHRH.

Contexte :

Comme expliqué dans la partie précédente, les souris restreintes présentent un défaut d'innervation de l'éminence médiane par les neurones à GHRH à 10 jours de vie. L'IGF-1 est un facteur de croissance fortement contrôlé par la nutrition, et j'ai pu montrer qu'il permettait de stimuler la croissance axonale des neurones à GHRH de façon préférentielle, au cours de cette période. En effet, l'IGF-1 n'est pas capable d'induire la croissance axonale des autres neurones du noyau arqué. De manière importante, la restriction alimentaire a également été associée à une diminution des taux circulants en insuline et en leptine à 10 jours de vie (Kappeler, L. *et al.*, 2009). L'insuline et la leptine sont des facteurs connus pour être fortement contrôlés par la nutrition et ont également été impliquées dans la neurogenèse.

Dans ce sens, l'insuline joue un rôle crucial dans la survie neuronale (Rhee, Y. H. *et al.*, 2013). D'autre part, l'insuline a également été associée avec l'innervation au niveau du PVN par les neurones régulant la prise alimentaire localisés dans le noyau arqué (Vogt, M. C. *et al.*, 2014). De plus, l'insuline active les mêmes voies de signalisation que l'IGF-1 : PI3K/AKT et MAPK. Bien que l'insuline présente dans le B27 ne semble pas impacter la croissance axonale des neurones à GHRH pour une concentration de 58nM, son éventuel rôle sur la croissance axonale à plus forte dose n'est pas à négliger.

Concernant la leptine, son implication dans la croissance axonale des neurones du noyau arqué régulant la prise alimentaire est également reconnue. Au cours de la lactation, une altération des taux de leptine induit une diminution de l'innervation du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus par les neurones à NPY/AgRP et POMC/CART (Bouret, S. G. *et al.*, 2006; Bouret, S. G. *et al.*, 2007; Bouret, S. G. *et al.*, 2008). Le traitement d'explants de noyaux arqués par la leptine engendre une croissance axonale de ces neurones (Bouret, S. G. *et al.*, 2008). De plus, la leptine a également été suggérée comme associée à la croissance axonale d'une autre sous-population neuronale du noyau arqué, les neurones à kisspeptine (Caron, E. *et al.*, 2012). Ces données suggèrent que la leptine pourrait avoir un rôle plus global sur la maturation des diverses sous-populations neuronales du noyau arqué.

Objectif :

L'objectif de ce travail consiste à identifier un éventuel rôle de l'insuline et de la leptine sur la croissance axonale des neurones à GHRH. L'impact de la nutrition postnatale précoce sur l'action de ces hormones sera également étudié.

Matériel & Méthodes :

Animaux : Des souris C57Bl/6J GHRH-eGFP (Balthasar, N. *et al.*, 2003) ont été élevées dans des conditions standards EOPS dans des cages ventilées à 22°C, selon un cycle 12h de jour et 12h de nuit. Les souris ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau. Les portées ont été nivelées à 6 petits par mère dans le cas d'une nutrition normale, et augmentées à 10 petits par mère afin d'induire une restriction alimentaire durant la lactation (Fiorotto, M. L. *et al.*, 1991; Kappeler, L. *et al.*, 2009). Après le sevrage naturel à 16 jours de vie, les souris sont nourries *ad libitum*. Les souriceaux ont pour la plupart été récupérés à 7 jours de vie, afin de réaliser des cultures d'explants. La récupération de plasma a quant à elle été réalisée par ponction cardiaque à 10 jours de vie ou à 90 jours de vie. Toutes les expérimentations animales ont été effectuées en accord avec les directives du comité éthique national français Charles Darwin (Agrément du protocole n° Ce5/2012/006).

ELISA : Les concentrations plasmatiques de leptine ont été mesurées à l'aide d'un kit ELISA (Mouse/Rat Leptin Quanikine ELISA, MOB00, R&D systems) sur le plasma de souris âgées de 10 jours et 90 jours. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre (TECAN, GENios Pro).

Culture de noyaux arqués d'hypothalamus : Des explants issus de souris âgées de 7 jours ont été mis en culture pendant 48H comme décrit précédemment [Decourtye, L. *et al.* en cours de soumission]. Brièvement, des coupes de cerveaux de 300µm ont été mises en culture dans un milieu MEM (21090-022, Life Technologies) supplémenté avec 10% de FCS (*fetal calf serum*), 0.5% de glucose et 1% de pénicilline/streptomycine. Les noyaux arqués ont ensuite été micro-disséqués et mis en culture en milieu Neurobasal (21103049, Life

Technologies) supplémenté avec 0.4% de méthylcellulose, du B27 avec insuline (17504044, Life technologies) ou sans insuline (A1895601, Life technologies), 0.5% de glucose, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. Après 24h de culture, les explants ont été traités avec 100ng/ml de Leptine (6.17nM, 450-31, PeproTech), 100ng/ml d'IGF-1 (13.2nM, 791-MG-050, R&D systems) ou entre 10nM et 1µM d'insuline (Actrapid Penfill) pendant 24h. Les explants ont ensuite été fixés en PFA 4% et une immunofluorescence a été réalisée avec les anticorps primaires suivants : anti-neurofilament (hôte : poulet, ab72958, abcam), anti-GFP (hôte : lapin, ab6556, abcam), anti-AgRP (hôte : lapin, H-003-57, Phoenix Pharmaceuticals), anti récepteur de la leptine (hôte : lapin, PA1-053, Thermo Fisher Scientific) ; et les anticorps secondaires correspondant : DyLight_594 anti-poulet (hôte : chèvre, ab96949, abcam), DyLight_488 anti-lapin (hôte : chèvre, ab96883, abcam), ou DyLight_549 anti-lapin (hôte : singe, ab98499, abcam). Les marquages neurofilaments et AgRP ont été visualisés sous un objectif 4X et le marquage GFP sous un objectif 10X à l'aide d'un microscope Olympus BX612. Le logiciel ImageJ ainsi que le pluggin NeuronJ ont été utilisés pour analyser la taille des axones. Brièvement, une moyenne de 20 axones et un maximum de 40 axones ont été mesurés pour chaque explant. Huit explants ont été mis en culture dans chaque condition, la longueur globale des axones a été estimée à partir de la moyenne par explant dans chaque condition. Afin de mesurer la croissance de façon relative, les conditions traitées ont été normalisées par rapport à leur condition contrôle dans chaque plaque. Chaque plaque expérimentale a été considérée comme n=1 pour les analyses statistiques.

Analyses statistiques : Les résultats ont été présentés comme la moyenne ± SEM. La comparaison entre deux groupes a été réalisée par un t-test de Student. Pour les cultures d'explants, les résultats issus d'une <u>double</u> immunofluorescence (*e.g.* NF/GFP) ont été analysés par un two-way ANOVA avec un test post-hoc Bonferroni. Les résultats issus d'une <u>simple</u> immunofluorescence (*e.g.* AgRP) ont été analysés par un one-way ANOVA avec un test post-hoc Newman Keuls. Les différences significatives ont été représentées par des astérisques, avec * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

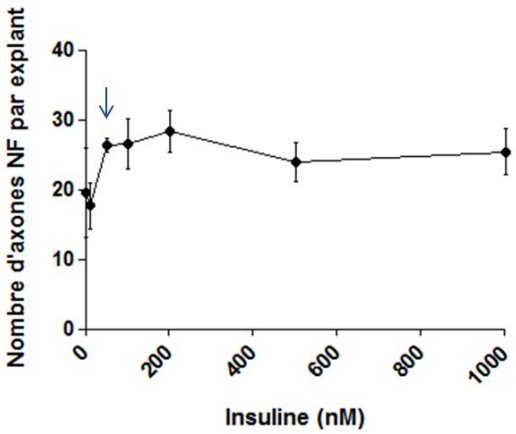

Figure 35 : Rôle de l'insuline sur le nombre d'axones quantifiés par explant. Estimation à partir du nombre d'axones quantifiés de l'effet de la concentration de l'insuline, sur la survie neuronale des neurones du noyau arqué (NF+), dans les cultures d'explants de souris **normalement nourries**. La flèche bleue représente la concentration en insuline présente dans le milieu B27 avec insuline utilisé dans d'autres expériences. Moyenne ± SEM, n=4-5 par groupe. Statistiques : One-Way ANOVA et test post-hoc Newman Keuls.

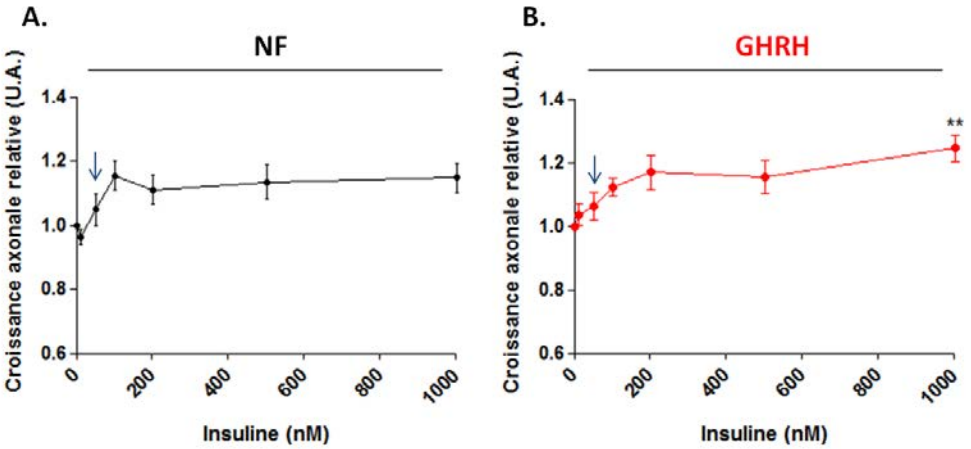

Figure 36 : Rôle de l'insuline sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué chez des souris **normalement nourries**. Croissance relative globale des neurones du noyau arqué labélisés par neurofilaments (NF) **(A.)**, et des neurones à GHRH **(B.)**. Les flèches bleues représentent la concentration en insuline présente dans le milieu B27 avec insuline utilisé dans d'autres expériences. Moyenne ± SEM, n=4-6 par groupe. Statistiques : One-Way ANOVA et test post-hoc Newman Keuls, avec **=p<0.01 0nM d'insuline *vs* 1µM d'insuline.

Résultats :

L'insuline ne stimule pas significativement la croissance axonale des neurones à GHRH.

Pour cette étude, nous avons dû utiliser un milieu de culture supplémenté en B27 sans insuline. Comme le montre les analyses précédentes, l'insuline présente tout d'abord un rôle important sur la survie neuronale. Bien que l'estimation du nombre d'axones mesuré par explant semble être augmentée pour des concentrations d'insuline de 50nM, nos données n'indiquent pas d'effet dose significatif **(Figure 35)**. Ces résultats suggèrent une meilleure survie des neurones et sont en accord avec d'autres études (Rhee, Y. H. *et al.*, 2013).

De plus, l'addition d'insuline permet une légère augmentation de la croissance des axones des neurones du noyau arqué (NF+), bien que celle-ci n'augmente pas de manière significative, notamment pour la concentration présente dans le B27 **(Figure 36 A)** (NF_insuline 1µM *vs* NF_insuline 0µM : 1.15±0.05, n=6 par groupe, NS). De même, la croissance des neurones à GHRH n'est pas stimulée de manière significative par les doses croissantes d'insuline **(Figure 36 B)**. Seule une concentration d'insuline de 1µM stimule significativement la croissance axonale des neurones à GHRH (GHRH_insuline 1µM *vs* GHRH_insuline 0µM : 1.25±0.05, n=6 par groupe, $p<0.01$). Cette dose non physiologique est connue pour activer l'IGF-1R. Ces données sont en accord avec nos précédents résultats et suggèrent elles aussi, une stimulation préférentielle de la croissance axonale des neurones à GHRH par l'IGF-1R.

Nous avons également étudié le rôle de l'insuline sur la croissance axonale des neurones à AgRP spécifiquement. Nous avons ainsi observé que l'insuline ne permet pas de stimuler significativement la croissance axonale des neurones de cette sous-population **(Figure 37)** (AgRP_insuline 200nM *vs* AgRP_insuline 0nM : 1.05±0.09, n=4 par groupe, NS). L'insuline a été associée dans de récentes études avec l'innervation du noyau paraventriculaire par les neurones à POMC/CART et à NPY/AgRP du noyau arqué (Vogt, M. C. *et al.*, 2014). Nos conditions d'expérimentation ne permettent pas de confirmer un rôle de l'insuline dans la croissance axonale de ces neurones.

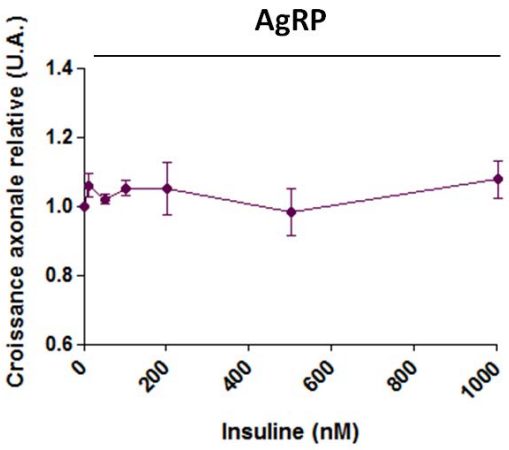

Figure 37 : Croissance axonale des neurones à AgRP traités à l'insuline chez les souris **normalement nourries**. Mesure de la croissance axonale relative en réponse à des doses croissantes d'insuline. Moyenne ± SEM, n=4 par groupe. Statistiques : One-Way ANOVA et test post-hoc Newman Keuls.

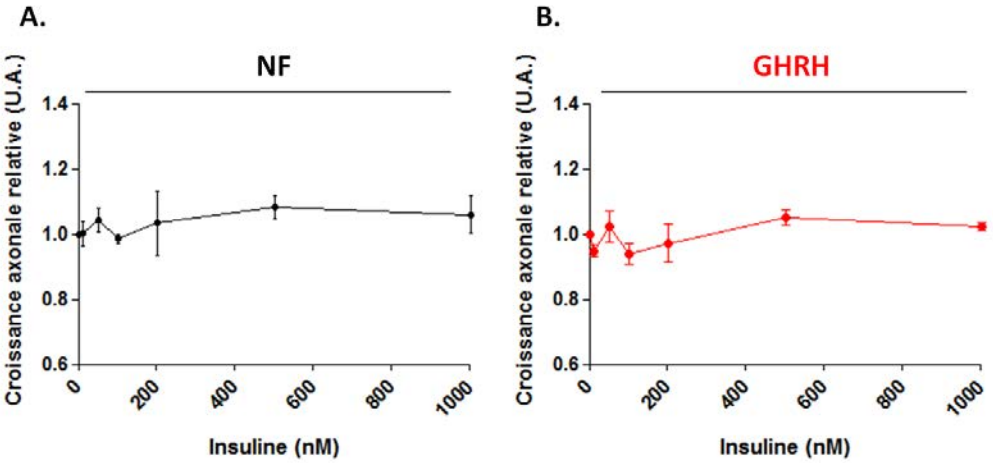

Figure 38 : Croissance axonale des neurones du noyau arqué issus de souris **restreintes** en période de lactation en présence de doses croissantes d'insuline. Marquage de tous les axones du noyau arqué (neurofilament, NF) **(A.)**, ou des neurones à GHRH spécifiquement **(B.)**. Moyenne ± SEM, n=3-4 par groupe. Statistiques : One-Way ANOVA et test post-hoc Newman Keuls.

Les explants issus de souris restreintes ne sont pas stimulés par l'insuline.

Afin d'étudier si la restriction alimentaire modulait le rôle de l'insuline sur les neurones à GHRH, les mêmes expériences ont été réalisées sur les explants de noyaux arqués issus de souris restreintes en période de lactation. De la même manière, la croissance axonale des neurones du noyau arqué n'est pas simulée quelle que soit la dose d'insuline **(Figure 38 A)**. De même, les neurones à GHRH ne présentent pas non plus d'augmentation de la croissance axonale pour une concentration de 1µM d'insuline **(Figure 38 B)** (GHRH_insuline1µM *vs* GHRH_insuline0nM : 0.96±0.07, n=4, NS). Les résultats confirment que la stimulation de l'IGF-1R par de fortes doses d'insuline n'est pas capable de stimuler la croissance axonale des neurones à GHRH issus de souriceaux restreints. De manière intéressante, on ne distingue plus de tendance positive sur la croissance axonale entre 0nM et 100nM d'insuline, ce qui suggère une perte de sensibilité aux effets de l'insuline par son récepteur. De même, l'insuline ne semble pas avoir d'effet sur la croissance axonale des neurones à AgRP (AgRP_insuline1000nM *vs* AgRP_insuline0nM : 1.01±0.10, n=2, NS) **(Figure 39)**. L'ensemble de ces données est cohérent avec l'absence d'altération de l'expression du récepteur à l'insuline chez les souriceaux restreints âgés de 10 jours **(Figure 40).**

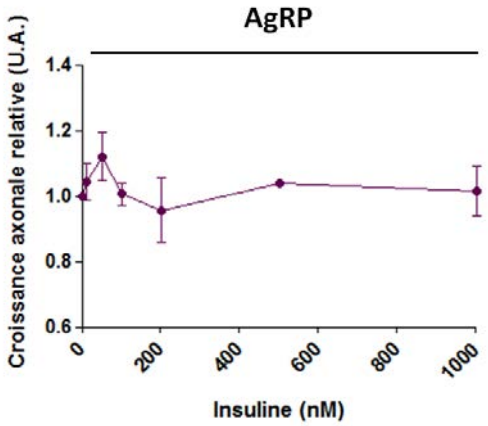

Figure 39 : Croissance axonale des neurones à AgRP traités à l'insuline chez des souriceaux **restreints**. Croissance axonale relative avec des doses croissantes d'insuline. Moyenne ± SEM, n=2-3 par groupe. Statistiques : One-Way ANOVA et test post-hoc Newman Keuls.

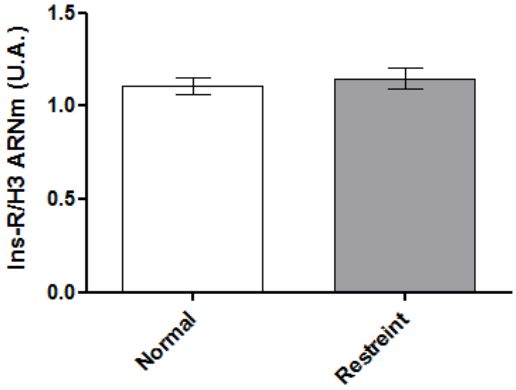

Figure 40 : Expression hypothalamique du récepteur à l'insuline à P10 chez des souriceaux mâles. Normalisation par le gène de ménage H3. Moyenne ± SEM, n=7 par groupe. Statistique : test de Student.

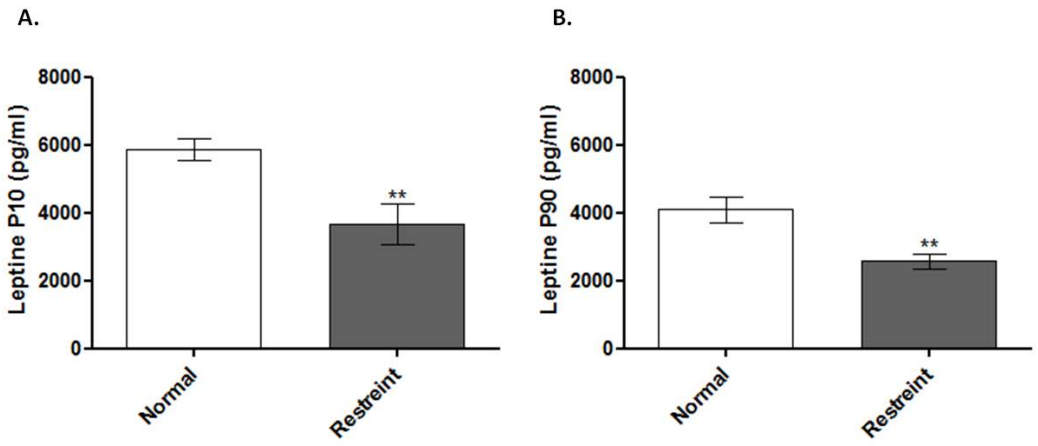

Figure 41 : Concentration plasmatique en leptine à 10 jours de vie et à 90 jours de vie chez des souris mâles normalement nourries ou restreintes en période de lactation. Moyenne ± SEM, n=8-10 par groupe. Statistique : Test de Student, avec **=p<0.01.

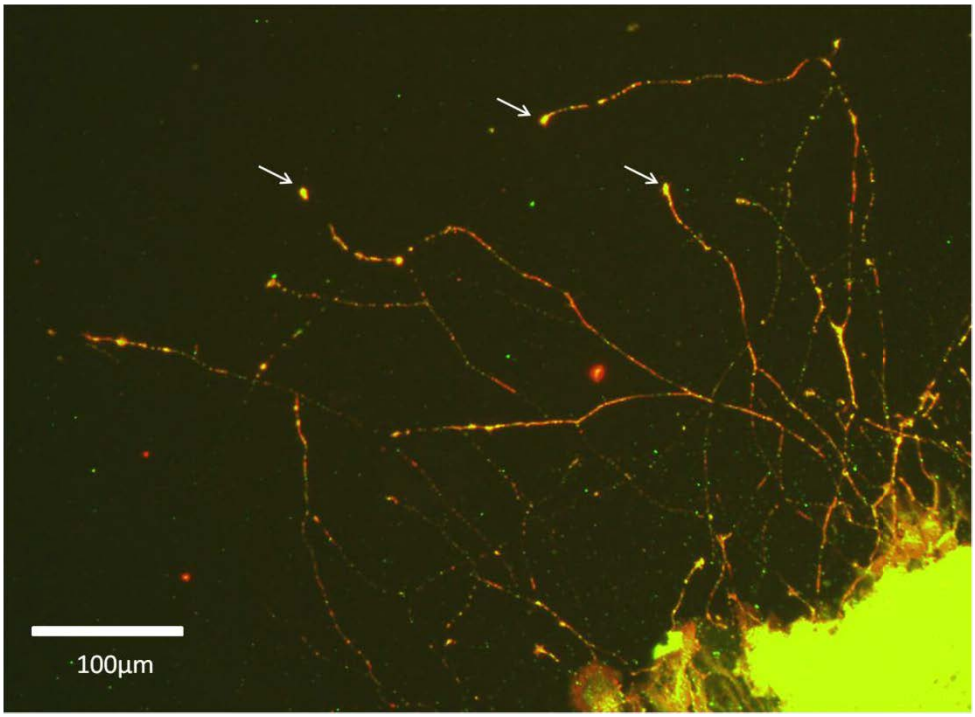

Figure 42 : Localisation du récepteur à la leptine sur les cultures d'explants de noyau arqué de souriceaux **normalement nourris** âgés de 7 jours. En vert marquage du récepteur de la leptine, en rouge marquage des axones du noyau arqué (neurofilament). Les flèches blanches mettent en évidence les cônes de croissance.

La leptine stimule la croissance axonale des neurones du noyau arqué.

La leptine est un facteur connu pour refléter l'état nutritionnel. Dans notre modèle de souris C57 Bl/6J restreintes, les concentrations plasmatiques de leptine à 10 jours et à 90 jours de vie sont diminuées comme attendu **(Figure 41)**. Nous avons ensuite analysé la localisation du récepteur à la leptine sur les explants issus de souris normalement nourries **(Figure 42)**. Le récepteur à la leptine a été localisé au niveau terminal des axones en croissance du noyau arqué, ce qui est également en faveur d'un rôle dans la régulation de la croissance axonale comme cela a été indiqué auparavant (Bouret, S. G., 2010).

Afin d'étudier le rôle de la leptine sur les neurones du noyau arqué, nous avons réalisé des cultures d'explants de noyau arqués issus de souris normalement nourries. Les résultats obtenus nous indiquent que, de manière concordante aux études précédentes, le traitement par la leptine induit une augmentation de la croissance axonale des neurones à AgRP (AgRP_Leptine : 627±98µm *vs* AgRP_Contrôle : 541±88, croissance relative 1.16±0.06, n=4 par groupe, $p<0.05$) **(Figure 43 A)** (Bouret, S. G., 2010). De façon surprenante, bien que l'IGF-1 ne stimule pas significativement la croissance axonale des neurones à AgRP, leur co-stimulation avec de la leptine et de l'IGF-1 semble abolir en parti les effets de la leptine. (AgRP_Leptine+IGF-1 *vs* AgRP_Contrôle : 1.03±0.03, n=4 par groupe, NS).

Les analyses nous indiquent également que la leptine est capable de stimuler la croissance axonale de tous les neurones du noyau arqué (NF_Leptine *vs* NF_Contrôle : 1.31±0.07, n=7 par groupe, $p<0.01$), mais est également capable de stimuler la croissance axonale des neurones à GHRH spécifiquement (GHRH_Leptine *vs* GHRH_Contrôle : 1.33±0.13, n=5 par groupe, $p<0.01$) **(Figure 43 B)**. Ainsi la leptine aurait un effet global sur les neurones du noyau arqué et stimulerait la croissance axonale des neurones régulant la prise alimentaire, et des neurones à GHRH régulant la croissance staturo-pondérale.

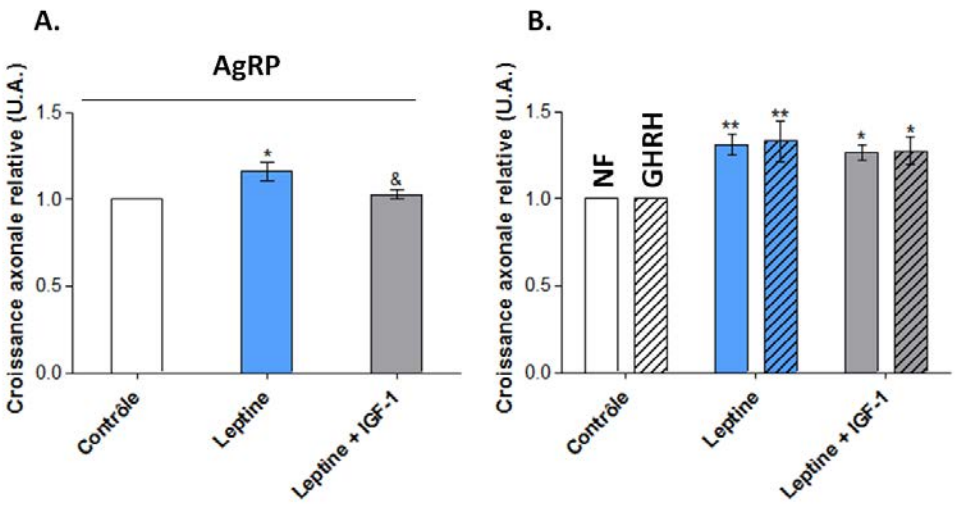

Figure 43 : Impact de la leptine sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué chez des souris **normalement nourries**. Mesure de la croissance axonale relative pour les neurones à AgRP **(A.)**, et pour les neurones du noyau arqué labélisés par le marquage des neurofilaments (NF, barres pleines), et les neurones à GHRH (barres hachurées) **(B.)**. Moyenne ± SEM, n=4-7 par groupe. Statistiques : One Way-Anova et test post-hoc Newman-Keuls (A.) et Two-Way ANOVA et test post-hoc Bonferroni, avec *=p<0.05 et **=p<0.01 pour X *vs* Contrôle selon le même marquage, et &=p<0.05 pour Leptine *vs* Leptine + IGF-1.

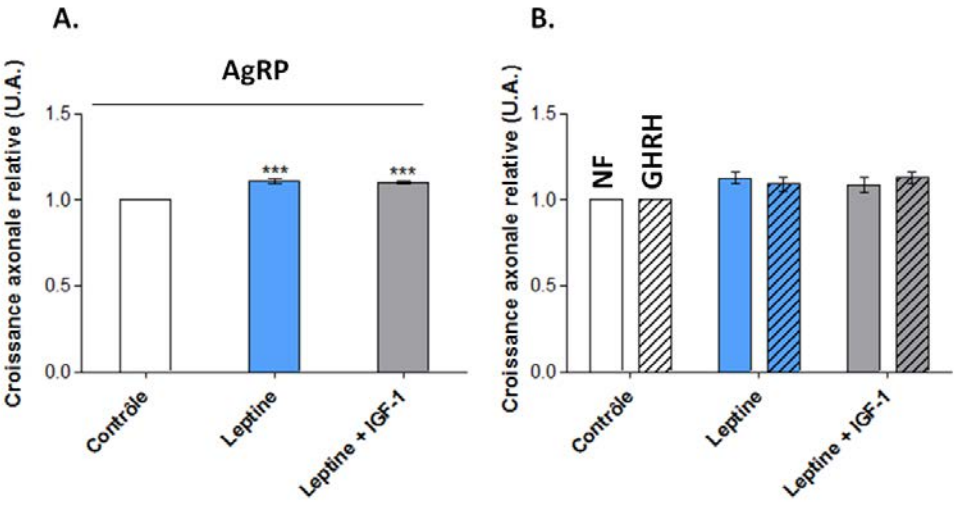

Figure 44 : Analyse de l'impact de la leptine sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué dans les explants issus de souris **restreintes**. Mesure de la croissance axonale des neurones à AgRP **(A.)**, et des axones des neurones du noyau arqué par marquage neurofilament (NF) ou des neurones à GHRH spécifiquement **(B.)**. Moyenne ± SEM, n=5-6 par groupe. Statistiques : Two-Way ANOVA et test post-hoc Bonferroni (A.) et One Way-Anova et test post-hoc Newman-Keuls (B.), avec ***=p<0.001 pour X *vs* Contrôle.

Les neurones à GHRH issus de souris restreintes sont résistants à la stimulation de la croissance axonale par la leptine.

Afin d'étudier l'impact de la restriction sur la réponse des neurones à la leptine, j'ai stimulé des explants de noyaux arqués issus de souris restreintes avec la leptine. De façon similaire aux souris normalement nourries, les neurones à AgRP continuent de répondre de manière significative à la leptine chez les souris restreintes (AgRP_Leptine *vs* AgRP_Contrôle : 1.11±0.02, n=5 par groupe, p<0.001) **(Figure 44 A)**. Cependant, de manière intéressante la leptine ne stimule plus la croissance axonale des neurones du noyau arqué de manière globale (NF+) ou des neurones à GHRH (NF_Leptine *vs* NF_Contrôle : 1.12±0.04, n=6 par groupe, NS ; GHRH_Leptine *vs* GHRH_Contrôle : 1.09±0.05, n=6 par groupe, NS) **(Figure 44 B)**. Les résultats préliminaires indiquent qu'il ne semble pas y avoir d'altération de l'expression du récepteur à la leptine au niveau hypothalamique **(Figure 45).**

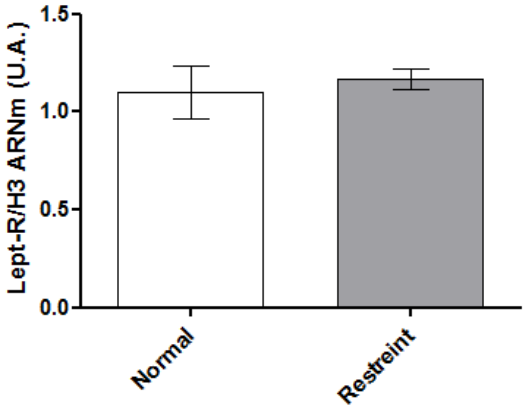

Figure 45 : Expression hypothalamique du récepteur à la leptine à 10 jours de vie, chez des souriceaux mâles normalement nourris ou restreints en période de lactation. Normalisation par le gène de ménage H3. Moyenne ± SEM, n=7 par groupe. Statistique : Test de Student.

Discussion :

Les résultats présentés dans cette étude indiquent que l'insuline ne présente pas d'effet significatif sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué de façon globale. De manière similaire, la croissance axonale des neurones à GHRH n'est pas stimulée significativement. Seule la dose non physiologique de 1µM d'insuline, qui active l'IGF-1R, est capable d'induire une stimulation de la croissance axonale des neurones à GHRH spécifiquement. Ces résultats confirment nos précédents résultats [Decourtye L. *et al*, en cours de soumission]. Bien que non significative, il est à noter une tendance positive de l'ajout d'insuline (100nM) sur la longueur des axones. Cet effet est probablement dû à l'action anti-apoptotique de l'insuline sur les neurones. En effet, les neurones sains présentent une croissance axonale basale significative, qui est abrogée lorsque les conditions de cultures ne permettent pas la survie des neurones.

Concernant la leptine, les résultats montrent que c'est un facteur essentiel à la croissance axonale des neurones du noyau arqué. En effet, la leptine était déjà connue pour son rôle dans la stimulation de la croissance axonale des neurones régulant la prise alimentaire NPY/AgRP et POMC/CART en période postnatale précoce (Bouret, S. G. *et al.*, 2004). De plus, un rôle sur la croissance des neurones kisspeptinergiques du noyau arqué a plus récemment été suggéré (Caron, E. *et al.*, 2012). Dans notre étude, nous avons confirmé que la leptine présentait un effet stimulateur sur la croissance des neurones du noyau arqué (marquage neurofilament), et plus particulièrement sur les neurones à NPY/AgRP régulant la prise alimentaire, mais également sur les neurones à GHRH. En accord avec les données précédentes (Bouret, S. G. *et al.*, 2004; Caron, E. *et al.*, 2012), nos résultats suggèrent un rôle beaucoup plus large pour la leptine sur la croissance axonale des neurones du noyau arqué.

La leptine est connue pour activer la voie JAK/STAT (Fruhbeck, G., 2006). De manière intéressante, bien que l'IGF-1 ait été impliqué dans la croissance axonale des neurones à GHRH chez les souris normalement nourries, le co-traitement avec l'IGF-1 et la leptine n'engendre pas d'effet synergique sur leur croissance axonale. De-même, le co-traitement des neurones à AgRP avec la leptine et l'IGF-1 engendre une croissance axonale moins grande que pour la leptine seule, bien que l'IGF-1 ne simule pas significativement la

croissance axonale de ces neurones. De tels résultats suggèrent l'existence d'interaction entres les voies de signalisation activées par ces deux facteurs. L'IGF-1R a également été associé avec l'activation de la voie JAK/STAT, ce qui induit la phosphorylation de STAT5 et active ainsi l'expression de SOCS6 (*suppressor of cytokine signaling 6*), élément du rétrocontrôle négatif de la voie JAK/STAT (Gupta, S. *et al.*, 2011). Ainsi, on pourrait supposer que la co-stimulation des neurones par l'IGF-1 et la leptine pourrait entraîner une désensibilisation et/ou un rétrocontrôle négatif limitant la croissance axonale.

D'autre part, nous avons observé que les neurones à GHRH issus de souris restreintes sont également résistants à la stimulation de la croissance axonale par la leptine, alors que celle-ci est connue pour utiliser la voie de signalisation JAK/STAT (Mendoza, M. C. *et al.*, 2011). De plus, l'absence d'altération de l'expression du récepteur à la leptine suggère une altération en aval des voies de signalisation stimulées par ce récepteur. De manière intéressante, il est à noter que la leptine a également été impliquée dans l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK (Fruhbeck, G., 2006). Des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer si la stimulation de la croissance axonale par la leptine passe par la voie JAK/STAT et/ou par les voies PI3K/AKT ou MAPK. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces voies de signalisation nous permettra de déterminer les voies essentielles à cette action de la leptine sur les neurones à GHRH. En parallèle des westerns blots seront réalisés, suite à une stimulation par la leptine, afin d'étudier les capacités de phosphorylation des voies impliquées, et de voir si la voie PI3K/AKT est activée. En effet, la leptine stimulant la voie PI3K/AKT, il est possible que la résistance des neurones à GHRH à la leptine, suite à une restriction au cours de la lactation, soit due à un défaut des capacités de phosphorylation d'AKT, de la même manière que pour la résistance à l'IGF-1. Néanmoins, les neurones à GHRH pourraient aussi présenter une résistance au niveau de la voie JAK/STAT.

En conclusion, nos résultats indiquent que le rôle de l'insuline semble être plus limité à la survie neuronale. La leptine quant à elle stimule la croissance axonale des neurones à GHRH au cours de la première semaine de vie, et pourrait programmer ainsi également l'activité de l'axe somatotrope à l'âge adulte. Dans ce sens, les souris $lep^{ob/ob}$ présentent une diminution de leur taille naso-anale à l'âge adulte (Yeh, J. K. *et al.*, 2006). Ces résultats élargissent l'importance de la leptine en période postnatale précoce et complètent les résultats

obtenus par Simmerly et ses collègues (Bouret, S. G. *et al.*, 2004). Nos résultats suggèrent un puissant rôle intégrateur de cette hormone. L'ensemble de ces résultats feront l'objet d'une publication une fois les expériences complémentaires requises réalisées.

Etude du retard de croissance intra utérin ou RCIU

Impact de la restriction nutritionnelle *in utero* sur la croissance et le métabolisme

Contexte :

Nous avons précédemment pu montrer que la croissance postnatale de la souris et l'activité de l'axe somatotrope à l'âge adulte étaient programmées par la nutrition en période postnatale précoce, durant la lactation. Cependant, les neurones du noyau arqué qui régulent la prise alimentaire et le métabolisme (NPY/AgRP, POMC/CART) et les neurones qui régulent la croissance (GHRH) sont générés au cours de la 3ème semaine de gestation chez la souris ($E_{15,5}$). Ces neurones pourraient ainsi également présenter une fenêtre de susceptibilité à la programmation au cours de la période *in utero*. En ce sens, si une altération de la nutrition au cours de la lactation engendre une plus grande susceptibilité aux pathologies de type cardio-métabolique à l'âge adulte (Kappeler, L. *et al.*, 2009), ceci est également observé lors d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Roseboom, T. *et al.*, 2006). Le RCIU touche 3 à 7% des naissances dans le monde (Romo, A. *et al.*, 2009). Il se caractérise par une cassure de la courbe de croissance *in utero*, ainsi qu'un petit poids et/ou une petite taille de naissance. Plusieurs études associent ainsi le petit poids à la naissance avec le développement de pathologies ultérieures (Hales, C. N. *et al.*, 1992; Barker, D. J., 1998; Roseboom, T. J. *et al.*, 2001; Roseboom, T. *et al.*, 2006; Olivier, P. *et al.*, 2007; Murray, E. *et al.*, 2015). Ces observations ont permis d'énoncer l'hypothèse de la programmation fœtale de pathologies à l'âge adulte (théorie de Barker) (Barker, D. J., 2007), et d'émettre le concept de l'origine développementale de la santé et des pathologies adultes (DOHAD, *developmental origins of health and diseases*) (Bateson, P. *et al.*, 2004; Gluckman, P. D. *et al.*, 2004; McMillen, I. C. *et al.*, 2005. Parmi les différentes causes, la dénutrition alimentaire en période *in utero,* qui est associée à une diminution des concentrations en IGF-1 chez les fœtus, est connue pour induire un RCIU (Fall, C. H. *et al.*, 1995; Roseboom, T. J. *et al.*, 2001; Holt, R. I., 2002).

Objectif :

Le premier objectif de ce projet est d'étudier l'étendue de la fenêtre de susceptibilité de la programmation de l'axe somatotrope par la nutrition en période fœtale. Le second objectif vise à déterminer l'impact d'une modulation de la nutrition durant la lactation sur des souriceaux nés avec un RCIU.

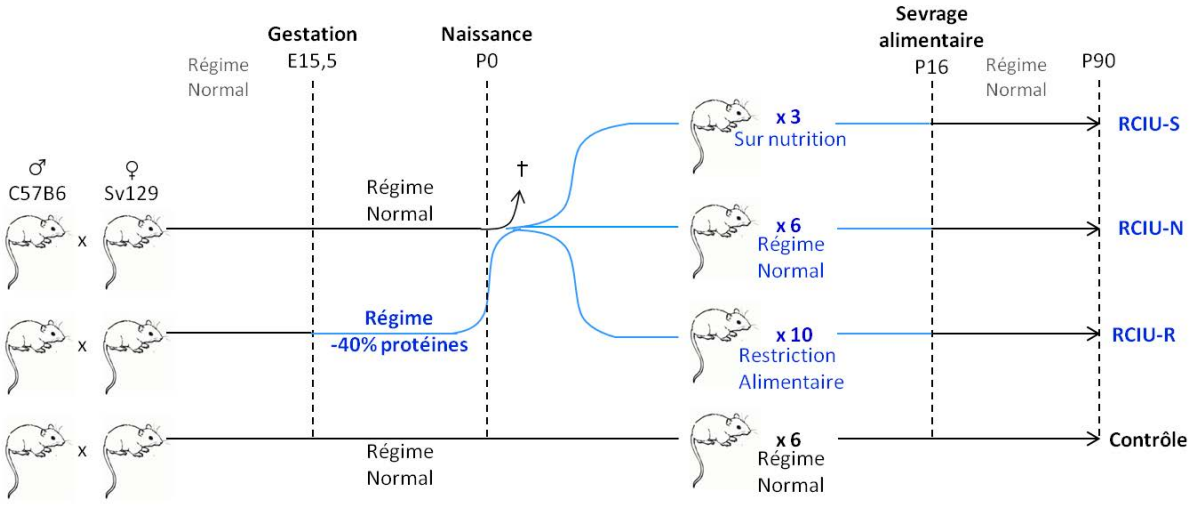

Figure 46 : Présentation du modèle murin d'induction de RCIU. Des mâles C57Bl/6J sont accouplés avec des femelles Sv129/Pas. Au 15ème jour de gestation, les femelles sont sous nourries avec un régime hypo-protéique (-40%) afin d'induire un RCIU. A la naissance, les nouveaux nés sont adoptés par une femelle contrôle et la taille des portées est normalisée à 3, 6 ou 10 petits par mère afin d'obtenir des souris sur-nourries, normalement nourries ou restreintes pendant la lactation. Ces portées seront comparées à une cohorte contrôle normalement nourrie en période périnatale.

Composition nutritive	**A03**	**R05-10**	**Pourcentage R05-10 *vs* A03**
protéines	21.4%	12.8%	- 40%
glucides	51.7%	60.7%	+ 17%
lipides	5.1%	3.2%	- 37%
fibres	4.0%	5.8%	+ 45%
minéraux cendres	5.7%	5.5%	- 3%
humidité	12.1%	12.0%	0%
Apport calorique	2830 kcal/kg	2652 kcal/kg	- 6%

Tableau 2 : Compositions nutritives des aliments utilisés pour le protocole de RCIU. Nous avons utilisé les aliments A03 (SAFE) comme régime normal car classiquement utilisé pour la reproduction, et l'aliment R05-10 (SAFE) qui est un régime hypo-protéique (-40% *vs* A03).

Ce projet montre les résultats préliminaires obtenus lors de la mise en place du modèle murin, avec les premiers indices quant à l'impact sur la programmation de l'axe somatotrope et sur les pathologies à l'âge adulte. Il est actuellement poursuivi par Sarah Saget, une étudiante en thèse du laboratoire.

Matériel & Méthodes :

Animaux : Des femelles WT (*wild type*) Sv129/Pas ont été croisées avec des mâles WT C57 Bl/6J (Charles River, L'Arbresle, France) afin de produire une descendance d'un fond génétique mixte (F1). On a utilisé ce fond génétique car il a déjà été utilisé dans plusieurs études et sa dynamique de croissance est bien connue dans le laboratoire (Kappeler, L. *et al.*, 2008; Kappeler, L. *et al.*, 2009; Xu, J. *et al.*, 2011). De plus, le comportement maternel de ces femelles est élevé et stable. Les souris ont été élevées dans des conditions standards EOPS dans des cages ventilées à 22°C, selon un cycle 12h de jour et 12h de nuit.

Le protocole d'induction du RCIU et de la modulation de la nutrition postnatale précoce est schématisé ci-contre **(Figure 46)**. Brièvement, le RCIU a été induit à partir du 15ème jour embryonnaire par une alimentation *ad libitum* des femelles gestantes avec un régime réduit de 40% en protéines (R05-10 (SAFE, Scientific animal food & engineering)) par rapport au régime contrôle (A03 (SAFE)) **(Tableau 2)**. A la naissance, les souriceaux ont été adoptés par une femelle contrôle ayant mis bas le même jour. Ceci nous a permis de contrôler l'alimentation des souriceaux par la taille des portées, sans avoir le biais d'une remise à niveau des stocks maternels en parallèle (non contrôlables et fluctuants avec le temps). Les portées ont été nivelées à 6 petits par mère dans le cas d'une nutrition normale (RCIU-N), 3 petits par mère dans le cas d'une surnutrition (RCIU-S), et 10 petits par mère dans le cas d'une restriction alimentaire (RCIU-R), en période de lactation. Ces trois groupes ont été comparés à un groupe dit contrôle, normalement nourri en période de gestation et de lactation.

Le poids et la taille naso-anale des fœtus ont été mesurés à $E_{15.5}$, $E_{17.5}$ et $E_{18.5}$ sur des femelles primipares. Le gain de poids en période postnatale a également été suivi individuellement 3 fois par semaines à partir du 5ème jour de vie (P5) jusqu'à 3 mois (P90). La cohorte a été sacrifiée à l'âge de 3 mois sous anesthésie par isofluorane. Le sang a été récupéré par ponction cardiaque avec de l'EDTA pour dosages hormonaux. Divers organes d'intérêts

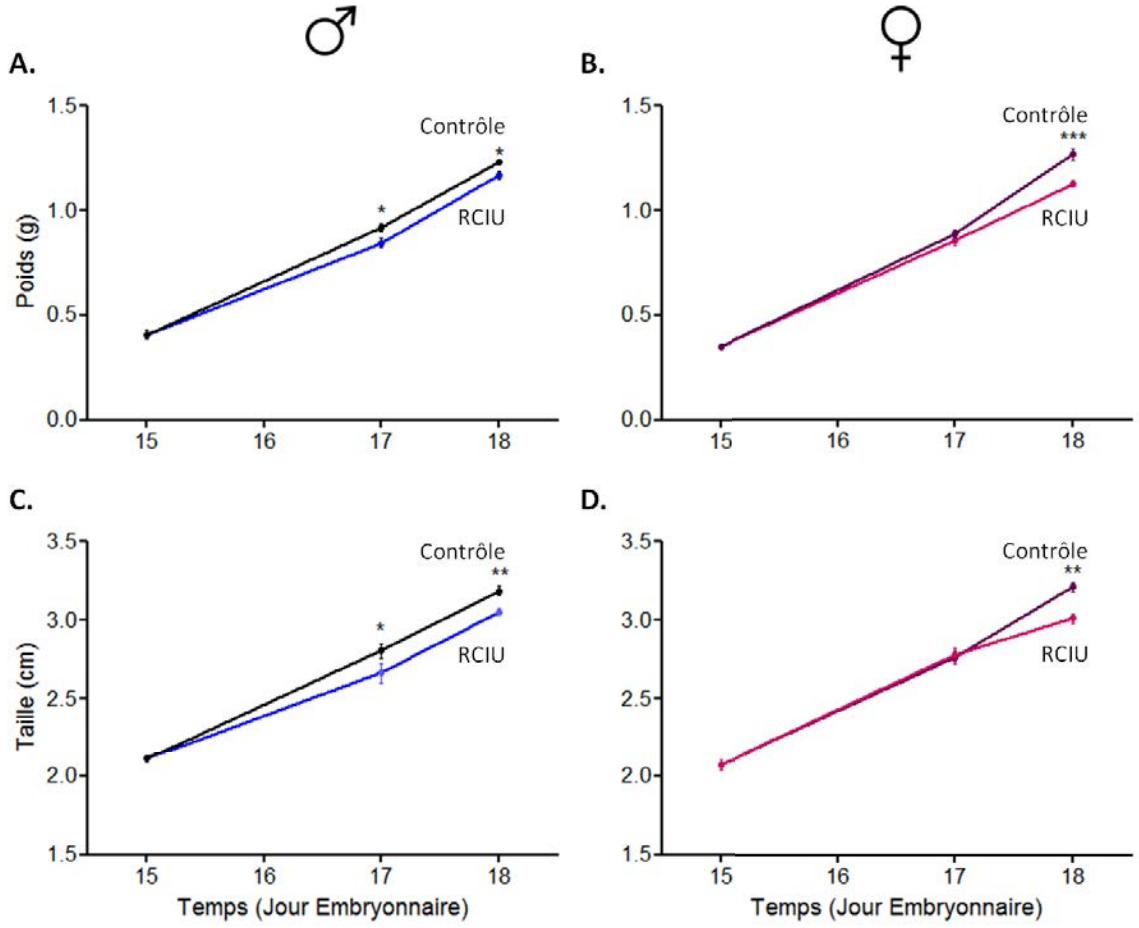

Figure 47 : Impact de la restriction alimentaire des femelles gestantes sur la croissance fœtale. Le poids et la tailles des fœtus mâles et femelles sont comparés suite à une nutrition maternelle normale (Contrôle) ou hypo-protéique à partir de $E_{15.5}$ (RCIU). Poids des fœtus mâles **(A.)**, poids des fœtus femelles **(B.)**, taille des fœtus mâles **(C.)**, taille des fœtus femelles **(D.)**. Moyenne ± SEM, n=8-15 par groupe. Statistique : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls, avec *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001.

(cerveau, foie, tissus adipeux périrénal, sous-cutané et abdominal, rein, *etc.*) ont été prélevés, pesés, congelés sur carboglace et stockés à -80°C, ou fixés au PFA 4%. Ce projet a été validé par le comité d'éthique Charles Darwin (n° d'agrément Ce5/2011/021).

Coloration hématoxyline et éosine : Les reins des souris ont été fixés au PFA 4% puis inclus en paraffine pour analyse histologique. Des coupes de 7 microns ont été réalisées. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline/éosine. Cette analyse a été effectuée en collaboration avec l'équipe de Marc Lombes (UMR-S 1185, Faculté de médecine Paris Sud, le Kremlin Bicêtre).

Analyses statistiques : Les résultats sont présentés comme la moyenne ± SEM. La comparaison entre les différents groupes est réalisée par un one-way ANOVA avec un test post-hoc Newman Keuls. La courbe de croissance est analysée par un two-way ANOVA avec un test post-hoc Bonferroni. Les différences significatives sont représentées par des astérisques, avec * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Résultats :

Impact de la restriction sur la croissance fœtale et postnatale.

Dans un premier temps, nous avons validé que le protocole d'alimentation des femelles gestantes avec un régime hypo-protéique à partir de $E_{15.5}$ engendrait bien un RCIU. La mesure et la pesée des fœtus à $E_{15.5}$, $E_{17.5}$ et $E_{18.5}$ confirment un effet significatif de la restriction protéique, avec des fœtus significativement plus petits et plus légers à $E_{18.5}$ **(Figure 47)**. De manière intéressante, la distinction des fœtus en fonction de leur sexe laisse apparaître un dimorphisme sexuel dans la sensibilité à la restriction maternelle protéique : les mâles semblent effectivement être affectés rapidement après la mise en place du régime alimentaire, avec une différence significative du poids et de la taille à partir du 17ème jour de gestation **(Figure 47 A, C)**. Chez les femelles en revanche, l'impact de la restriction semble plus tardif, avec une altération de la taille et du poids significative à partir de 18 jours de gestation **(Figure 47 B, D)**.

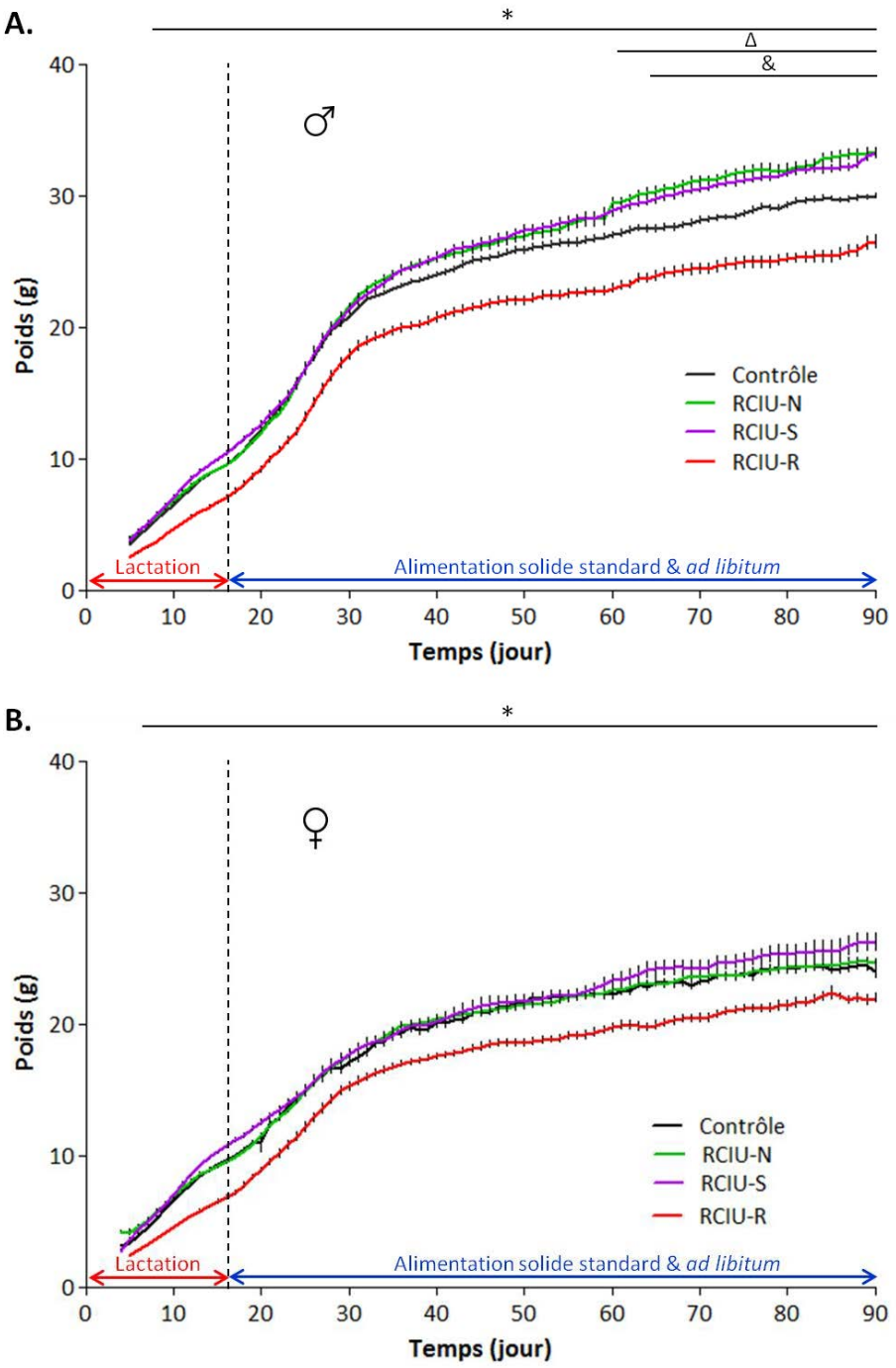

Figure 48 : Courbes de croissances postnatales en fonction de la nutrition périnatale chez des souris RCIU. Suite à un RCIU, la taille des portées est normalisée à 3 petits par mère pour une surnutrition (RCIU-S), 6 petits pour une alimentation normale (RCIU-N) et 10 petits pour une restriction alimentaire (RCIU-R). Le poids corporel est suivi 3 fois par semaine entre P5 et P90 chez les mâles **(A.)** et les femelles **(B.)** comparés à un groupe contrôle. Moyenne ± SEM, n=10-13 par groupe. Statistiques : Two-Way ANOVA et test post-hoc Bonferroni, avec *=RCIU-R *vs* Contrôle, Δ=RCIU-N *vs* Contrôle, &=RCIU-S *vs* Contrôle.

Ces résultats montrent que la restriction protéique de 40% durant la 3ème semaine de gestation est suffisante pour induire un RCIU, et révèlent un comportement différent des fœtus mâles et femelles dès le stade *in utero*. Nous avons poursuivi l'étude du **développement staturo-pondéral** en période postnatal et testé l'effet de divers régimes alimentaires en période de lactation.

Chez les mâles, les courbes de croissances indiquent que les souris nées avec un RCIU et restreintes en période de lactation (RCIU-R) ne présentent pas de rattrapage de la croissance. Les souris RCIU-R ont une croissance diminuée de manière permanente par rapport aux contrôles, malgré un accès *ad libitum* à une alimentation normale après le sevrage nutritionnel naturel à 16 jours de vie **(Figure 48 A)**. Les souris RCIU normalement nourries durant la lactation (RCIU-N) et sur-nourries (RCIU-S) présentent un rattrapage de croissance rapide (poids identique au contrôle dès P5). De plus, elles développent un poids corporel significativement plus élevé que les contrôles à partir de 60 et 64 jours respectivement, et qui perdure par la suite **(Figure 48 A)**.

Les souris femelles nées avec un RCIU et restreintes en période de lactation (RCIU-R) présentent un poids diminué dès P5, et ne présentent pas non plus de rattrapage de la croissance. Les femelles RCIU-N possèdent une courbe de croissance identique à celle des contrôles avec un rattrapage très rapide de la croissance dès P5. Les RCIU-S tendent quant à elles à devenir plus lourdes à 3 mois de vie, mais de façon non significative **(Figure 48 B.)**.

Nous avons ensuite analysé si le développement de l'axe somatotrope pouvait être impacté par la dénutrition *in utero*, et si les souris nées avec un RCIU pouvaient présenter une taille naso-anale différente des souris contrôles à l'âge adulte.

Les souris RCIU femelles présentent globalement une tendance à être plus petites que les contrôles indépendamment de leurs régimes postnatals précoces, bien que non significative **(Figure 49 A)**. En ce qui concerne les mâles, seules les souris RCIU-R sont significativement plus petites que les souris contrôles à l'âge adulte. La une taille identique entres les RCIU-N et les contrôles suggère que le RCIU ne semble pas impacter la programmation de l'axe somatotrope. En revanche, ces augmentations du poids des souris associées au

maintien de leur taille, suggèrent une altération du métabolisme. Nous avons donc mesuré l'index de Lee qui correspond à l'indice de masse corporel (IMC) chez la souris **(Figure 49 B)**. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'IMC dans les deux sexes pour les souris sur-nourries suite à un RCIU (RCIU-S) comparativement aux contrôles. A l'inverse, l'IMC n'est pas significativement modifié chez les RCIU-R, pour les deux sexes, bien qu'une tendance à la diminution soit observée. De plus, on observe que la nutrition normale au cours de la lactation suite à un RCIU (RCIU-N) engendre un IMC augmenté à l'âge adulte chez les mâles spécifiquement **(Figure 49 B)**. Ces résultats indiquent ainsi que les souris mâles RCIU-S (sur-nourries) et RCIU-N (normalement nourries) pourraient présenter un ratio masse grasse/masse maigre augmenté, ce qui pourrait potentiellement être associé à des dérégulations du métabolisme.

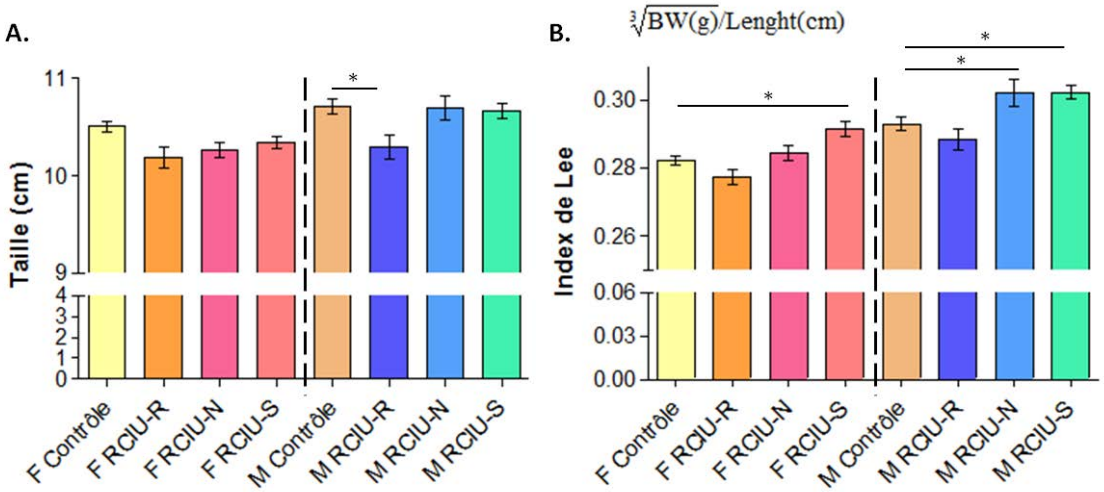

Figure 49 : Effet du RCIU sur la taille et l'index de Lee chez la souris. Taille naso-anale à 3 mois **(A.)** et Index de Lee **(B.)**. Mesures effectuées dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) en période de lactation, chez les femelles (F) et les mâles (M). L'index de Lee, indice de masse corporelle chez les rongeurs, est calculé selon la formule $\frac{\sqrt[3]{PoidsCorporel}}{Taille\ Naso-anale}$. Moyenne ± SEM, n=8-14 par groupe. Statistiques : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls, avec *=p<0.05 X *vs* Contrôle du même sexe.

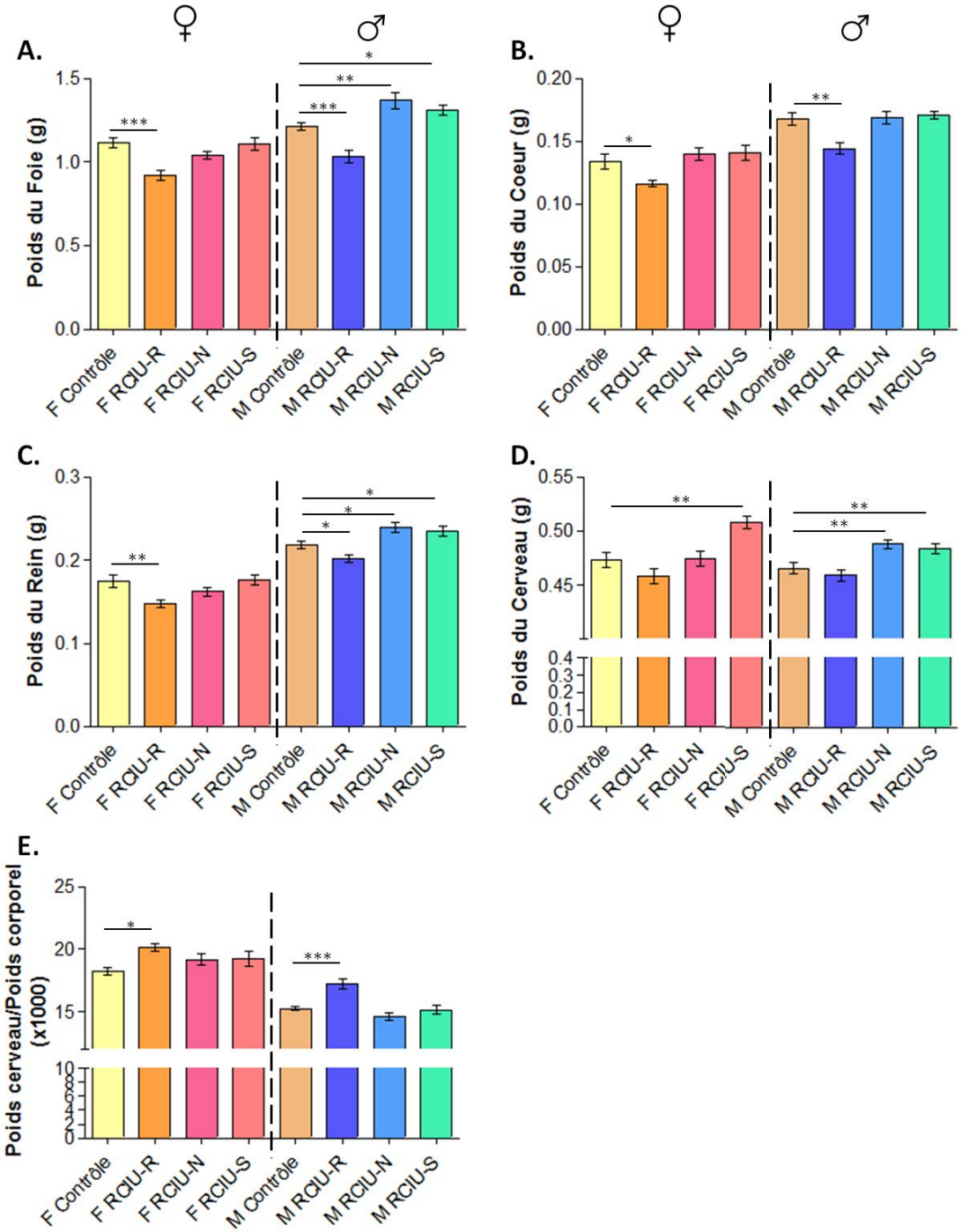

Figure 50 : Données anthropométriques des souris adultes nées avec un RCIU. Le poids des organes est mesuré à l'âge de 3 mois dans les différents groupes de souris RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) en période de lactation, chez les femelles (F) et les mâles (M). Poids du foie **(A.)**, poids du cœur **(B.)**, poids du rein **(C.)**, poids du cerveau **(D.)**, poids relatif du cerveau par rapport au poids corporel **(E.)**. Moyenne ± SEM, n=9-15 par groupe. Statistiques : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls, avec *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001 X *vs* Contrôle du même sexe.

Données anthropométriques chez des souris à l'âge adulte nées avec un RCIU.

Afin d'étudier la masse maigre chez nos souris, différents organes ont été récupérés et pesés afin de réaliser une **analyse anthropométrique**. La restriction chez les RCIU (RCIU-R) induit dans les deux sexes un foie, un cœur et des reins plus petits par rapport aux contrôles **(Figure 50 A - C)**. La nutrition normale (RCIU-N) engendre, seulement chez les mâles, un cerveau, un foie et des reins plus gros que les contrôles, tandis que les femelles RCIU-N ne présentent pas de différence avec les contrôles **(Figure 50 A, C et D)**. La surnutrition en période de lactation (RCIU-S) induit chez les mâles un phénotype comparable aux RCIU-N, avec un cerveau, un foie et des reins plus gros que les mâles contrôles. Chez les femelles, la surnutrition engendre un cerveau plus gros que les femelles contrôles **(Figure 50 D)**. De manière intéressante, le poids relatif des organes par rapport au poids corporel n'est pas modifié pour le foie, le cœur et le rein chez les souris nées avec un RCIU quel que soit la nutrition postnatale précoce. De plus, le poids relatif du cerveau est également inchangé pour les groupes RCIU-S et RCIU-N **(Figure 50 E)**. Ces résultats indiquent une altération homogène du poids des organes par rapport au poids global. En revanche, les souris RCIU-R présentent un poids relatif du cerveau augmenté dans les deux sexes, ce qui suggère un développement préservé du cerveau suite à une dénutrition périnatale importante.

Comme attendu aux vues des précédentes publications (Bueno, M. P. *et al.*, 2010), le RCIU induit, par notre modèle de nutrition hypo-protéique de la femelle gestante à partir de $E_{15.5}$, une diminution de la **densité glomérulaire** indépendamment de la nutrition postnatale et suggère une diminution de la capacité de filtration glomérulaire **(Figure 51)** (analyse réalisée par le Dr. Marc Lombes).

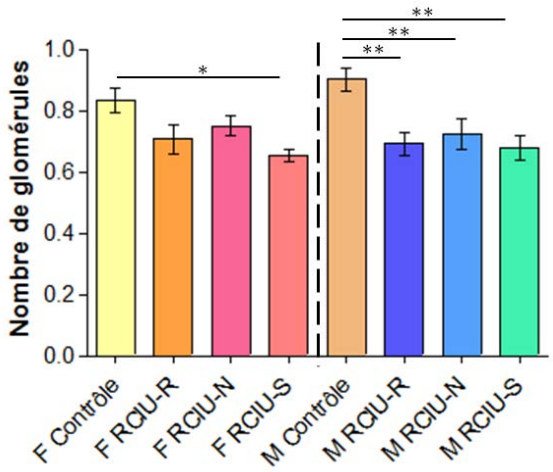

Figure 51 : Estimation de la densité glomérulaire des souris adultes nées avec un RCIU (nombre par mm^2 pour la surface rénale). Mesure réalisée à P90 sur les différents groupes. Moyenne ± SEM, n=8-15 par groupe. Statistiques : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls, avec *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001.

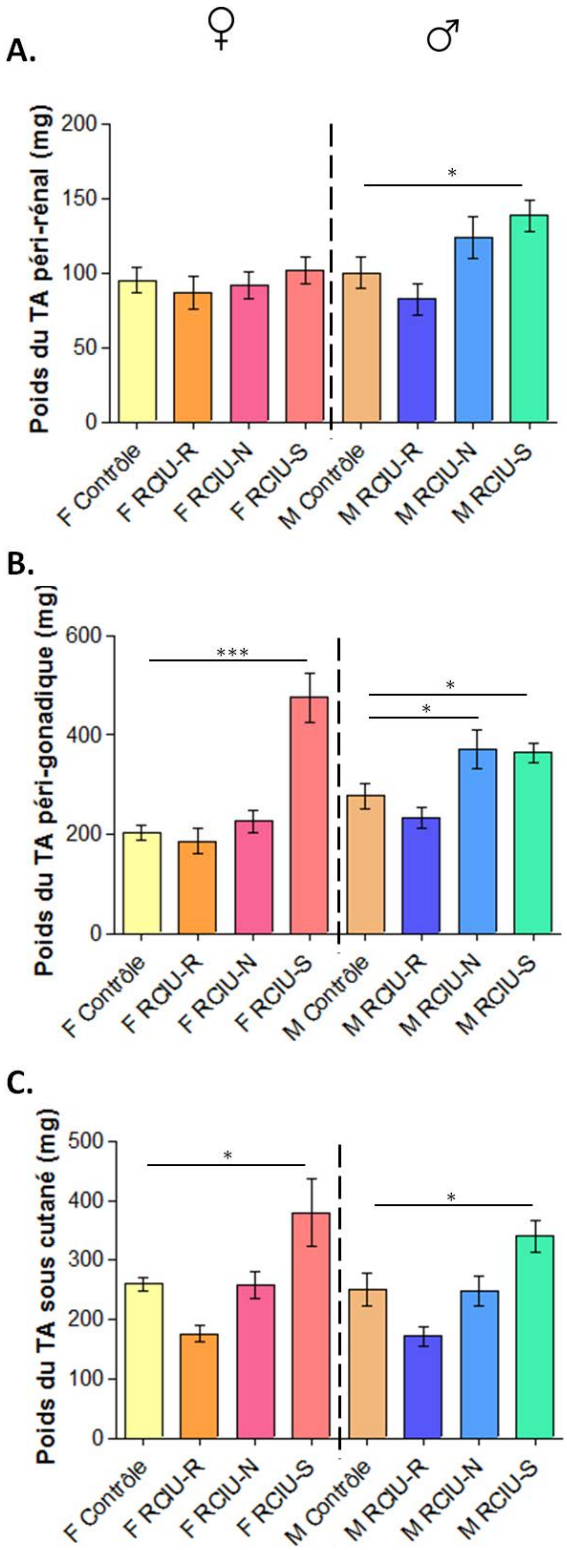

Figure 52 : Poids du tissu adipeux des souris adultes nées avec un RCIU. Les tissus adipeux des souris ont été récupérés et pesés dans nos différents groupes de RCIU restreintes (RCIU-R), normalement nourries (RCIU-N) ou sur-nourries (RCIU-S) en période de lactation, à l'âge de 3 mois, chez les femelles (F) et les mâles (M). Tissu adipeux périrénal **(A.)**, Tissu adipeux péri-gonadique **(B.)**, Tissu adipeux sous-cutané **(C.)**. Moyenne ± SEM, n=9-15 par groupe. Statistiques : One Way Anova et test post-hoc Newman-Keuls, avec *=p<0.05, ***=p<0.001 X *vs* Contrôle du même sexe.

Nous avons ensuite étudié la **masse grasse** de nos souris. Pour cela, nous avons récupéré et pesé les tissus adipeux péri-rénaux, sous-cutanés et péri-gonadiques dans nos différents groupes **(Figure 52)**. De manière intéressante, la restriction chez les RCIU (RCIU-R) n'induit pas de différence significative du poids des différents tissus adipeux par rapport aux contrôles. Cependant une forte tendance, bien que non significative, à la baisse pour le tissu adipeux sous-cutané a été notée. La nutrition normale chez les RCIU (RCIU-N) induit une augmentation significative du poids du tissu adipeux péri-gonadique et une forte tendance pour le tissu adipeux péri-rénal seulement chez les mâles **(Figure 52 B.)**. L'absence de différence observée chez les femelles est en accord avec les indications obtenues avec l'index de Lee. La surnutrition en période postnatale précoce suite à un RCIU (RCIU-S) engendre une augmentation du tissu adipeux sous cutané et péri-gonadique dans les deux sexes, et une augmentation du tissu adipeux péri-rénal chez les mâles **(Figure 52)**.

Discussion :

Afin d'étudier la fenêtre de susceptibilité de la programmation de l'axe somatotrope ainsi que la susceptibilité aux pathologies ultérieures, nous avons mis en place un modèle de RCIU par un régime maternel hypo-protéique à partir de $E_{15.5}$. La taille des portées a ensuite été modifiée afin d'induire en période de lactation une nutrition restreinte (RCIU-R), normale (RCIU-N) ou une surnutrition (RCIU-S). Les résultats préliminaires indiquent que la croissance staturale postnatale ne semble pas être impactée par le RCIU à lui seul. Les souris nées avec un RCIU présentent à l'âge adulte un indice de masse corporelle et des modifications des données anthropométriques suggérant des atteintes métaboliques.

Les données préliminaires de ce travail, ont permis de vérifier la validité du modèle de souris pour l'induction du RCIU, ainsi que l'impact de l'alimentation au cours de la lactation chez ces souris. Les résultats de cette étude montrent que la restriction protéique *in utero* induit un retard de croissance, caractérisé par une cassure de la courbe de croissance fœtale et une diminution d'environ 7% du poids à $E_{18.5}$ (-4% pour les mâles et -11% pour les femelles). La nutrition au cours de la période *in utero* semble avoir des effets sexes dépendants, avec des souris mâles touchées plus précocement que les souris femelles. En effet, la cassure de la courbe de croissance chez les mâles est significative dès $E_{17.5}$, tandis que les femelles ont une

cassure de la courbe de croissance plus tardive significative à $E_{18.5}$. Ces données suggèrent probablement une capacité d'adaptation placentaire accrue chez les fœtus femelles, comme cela a préalablement été suggéré (Aiken, C. E. *et al.*, 2013). Ces observations ont notamment permis d'émettre l'hypothèse d'un investissement maternel au cours de la conception qui serait différent entres les mâles et les femelles (Aiken, C. E. *et al.*, 2013). Ces données indiquent ainsi l'existence d'un important dimorphisme sexuel en réponse au RCIU dès le stade fœtal.

Concernant la croissance postnatale, le rattrapage rapide de la croissance chez les souriceaux RCIU induit par une nutrition normale au cours de la lactation (RCIU-N) n'engendre pas de modification significative staturale dans les deux sexes. Cependant, le maintien de la restriction au cours de la lactation (RCIU-R) engendre une altération staturale durable. Ces données nous indiquent que la période fœtale ne semble pas impacter la programmation de l'axe somatotrope ou serait en partie modulée par l'alimentation en période postnatale précoce. Ainsi, la période postnatale précoce semble d'importance majeure pour programmer sa mise en place chez la souris.

Afin d'étudier l'impact de la nutrition périnatale sur la susceptibilité aux pathologies de type cardio-métabolique à l'âge adulte, nous avons récupéré et pesé différents organes. En accord avec de précédentes études (Bueno, M. P. *et al.*, 2010), les reins issus des souris ayant subits un retard de croissance intra utérin présentent moins de glomérules dans les deux sexes. Cette diminution du nombre de glomérule peut être associée avec une diminution des capacités de filtration glomérulaire à l'âge adulte, qui pourrait faciliter l'apparition d'hypertension artérielle avec l'âge.

Concernant l'indice de masse corporelle des souris, les mâles RCIU-N présentent à l'âge adulte une augmentation de leur IMC associée à des altérations du poids des tissus adipeux et des données anthropométriques avec un cerveau, un foie et des reins plus gros. L'augmentation de leur IMC suggère la mise en place d'une obésité à l'âge adulte. De manière intéressante, chez les mâles, les souriceaux nés avec un RCIU, qu'ils soient normalement nourris (RCIU-N) ou sur-nourris en période de lactation (RCIU-S) semblent

présenter un phénotype comparable à l'âge adulte. Ainsi, pour un nouveau-né RCIU pronostiquant un environnement nutritionnel appauvri, un rattrapage rapide de la croissance induit pas une re-nutrition normale semble être considéré comme une surnutrition. Chez les femelles, qui présentent une moindre sensibilité *in utero* à la restriction protéique, seule une surnutrition peut entraîner une modification du poids à l'âge adulte et de l'indice de masse corporel. Les altérations de l'indice de masse corporel et du poids des organes sont en accord avec l'émergence des pathologies de type cardio-métabolique à l'âge adulte et devront être analysées. Notre modèle d'altération de la nutrition périnatale établit des résultats préliminaires qui doivent être complétés par des analyses histologiques et moléculaires des tissus comme le foie et le tissu adipeux afin de détecter d'éventuelles altérations. Une coloration à l'*oil red O* nous permettra par exemple d'observer l'accumulation de lipides et de déterminer une éventuelle mise en place de stéatose hépatique. Nos résultats suggèrent un risque pour ces souris de développer des pathologies de type cardio-métabolique avec l'âge. Ainsi, des tests de tolérance au glucose et à l'insuline, ainsi que des mesures des profils lipidiques et de la pression artérielle seraient à réaliser. A l'inverse, le maintien de la restriction en période postnatale précoce (RCIU-R) ne semble pas induire d'altération métabolique notable. Ces résultats préliminaires font l'objet d'une suite par un projet de thèse réalisé par Sarah Saget au sein du laboratoire.

Les analyses postnatales des RCIU normalement nourris (RCIU-N) mettent également en évidence un dimorphisme sexuel avec les femelles qui ne présentent pas d'altérations phénotypiques à l'âge adulte. Au vu de ces résultats, on peut supposer que les mâles présenteraient avec l'âge des pathologies de type cardio-métabolique probablement plus précocement que les femelles. Nos résultats seraient en accords avec de nombreuses études qui démontrent un dimorphisme sexuel dans l'émergence des pathologies adultes suite à une altération de l'environnement anténatal, avec des mâles plus sujets aux pathologies adultes que les femelles (Aiken, C. E. *et al.*, 2013).

De manière intéressante, chez les RCIU-R mâles et femelles, le ratio du poids du cerveau par rapport au poids corporel de la souris est augmenté suggérant un développement préservé du cerveau par rapport au reste de l'organisme, probablement afin de préserver au

mieux les fonctions neurologiques. Les capacités de mémorisation et d'apprentissage dans nos différents groupes seront donc également à étudier.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence une corrélation directe entre les concentrations en IGF-1 et en leptine et la programmation de l'axe somatotrope. Ces deux hormones fortement régulées par la nutrition semblent capables de stimuler la croissance axonale des neurones à GHRH en période postnatale précoce, et d'assurer ainsi la mise en place des cellules somatotropes hypophysaires. Les neurones à GHRH issus des souriceaux restreints en période de lactation sont quant à eux résistants à la stimulation de la croissance axonale par l'IGF-1 et la leptine. En revanche, la mise en place d'un modèle de RCIU indique que la période anténatale ne semble pas impacter la programmation de l'axe somatotrope. En outre, ce modèle nous permettra d'étudier à plus long terme l'émergence des pathologies de type cardio-métabolique en fonction de la nutrition périnatale.

Les résultats de ces études mettent en évidence les mécanismes précoces de la programmation de l'activité de l'axe somatotrope à l'âge adulte. Dans un premier temps, je me suis attachée à vérifier l'impact d'une dénutrition postnatale précoce sur notre modèle de souris sur fond génétique C57 Bl/6J, différent du fond génétique mixte 129/SvPas x C57 Bl/6J précédemment utilisé (Kappeler, L. *et al.*, 2009). Dans mon étude, les résultats obtenus dans le cadre d'une restriction alimentaire en période postnatale précoce sur la programmation de l'axe somatotrope sur un fond génétique C57 Bl/6J sont en accord avec les précédents résultats obtenus par Kappeler *et al.* sur un fond génétique mixte (129/SvPas x C57 Bl/6J) (Kappeler, L. *et al.*, 2009). En effet, la restriction induit chez les souris une altération staturo-pondérale permanente, avec un effet plus marqué chez les mâles. De plus, les souris présentent une diminution de l'innervation de l'éminence médiane par les neurones à GHRH de manière transitoire (P10), associée à une hypoplasie hypophysaire en cellules somatotropes (dès P20).

Nos résultats sont également en accord avec ceux obtenus sur les souris *Igf-1r* hétérozygotes spécifiquement au niveau du SNC, qui présentaient un défaut transitoire d'innervation des neurones à GHRH, associé à une hypoplasie hypophysaire permanente des cellules somatotropes (Kappeler, L. *et al.*, 2008). Ces résultats nous permettent de faire le lien entre nutrition postnatale précoce et programmation de l'axe somatotrope par l'intermédiaire de l'IGF-1. Nos résultats ont ainsi montré que la restriction au cours de la lactation induite par une augmentation de la taille des portées, chez les souris C57B6, était suffisamment

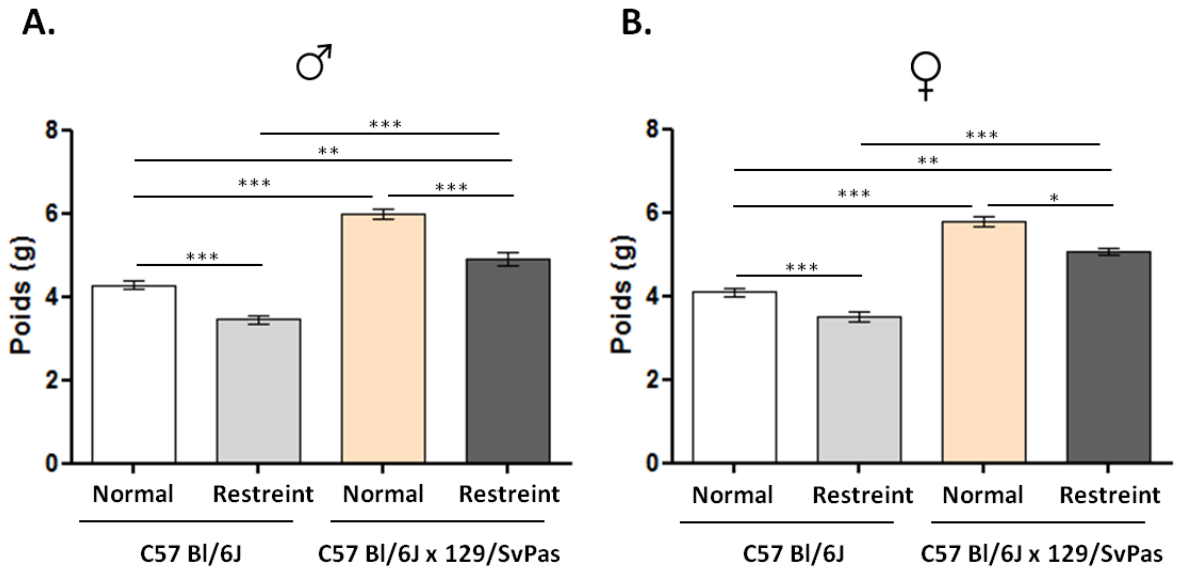

Figure 53 : Poids corporel des souriceaux de fond génétique C57 Bl/6J ou C57Bl/6J x129/SvPas. Mesure du poids corporel à P7 chez les mâles et les femelles. Moyenne ± SEM, n=3-35 par groupe. Statistiques : One Way Anova et test post-hoc Newman Keuls, avec *=p<0.05, **=p<0.01 et ***=p<0.001.

importante pour altérer la mise en place de l'axe somatotrope, et conforte ainsi la relevance physiologique de la programmation de cet axe. Néanmoins, nous avons également observé que certains paramètres de l'axe somatotrope semblent moins fortement impactés chez les souris C57 Bl/6J restreintes que chez les souris C57 Bl/6J x 129/SvPas restreintes. Ces résultats suggèrent que la programmation de l'axe somatotrope par la nutrition et l'IGF-1 pourrait être modulée selon le fond génétique. En effet, l'impact d'un défaut de signalisation IGF-1 semble être dépendant du fond génétique utilisé (Xu, J. *et al.*, 2014). Il a notamment été montré que les souris 129Sv/Pas présentent une activité de l'axe somatotrope plus élevée que les C57 Bl/6J (Xu, J. *et al.*, 2014). Dans ce sens, les souris 129/SvPas présentent une taille supérieure, ainsi que des taux circulants d'IGF-1 et d'ALS augmentés par rapport aux souris C57 Bl/6J. Les capacités de phosphorylations de l'IGF-1R sont également supérieures chez les 129/SvPas. Ainsi, les souris 129/SvPas semblent plus sensibles à l'inactivation hétérozygote d'*Igf-1r* (Xu, J. *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent également que l'action stimulatrice de l'IGF-1 sur la croissance axonale des neurones à GHRH du noyau arqué pourrait être également modulée en fonction du fond génétique utilisé. De plus, il est possible que le timing de mise en place de cet axe varie. En effet, le poids des souris 129/SvPas est plus important que les souris C57 Bl/6J dès 7 jours de vie **(Figure 53)**. Cependant, il ne faut pas négliger l'investissement maternel qui varie également beaucoup entres ces deux souches de souris. Ainsi, une femelle 129/SvPas aura plus tendance à s'occuper de ces petits et à les nourrir, à la différence d'une femelle C57 Bl/6J qui passera moins de temps à s'occuper de ses petits. De plus la composition du lait pourrait également varier.

Les souris C57 Bl/6J restreintes en période de lactation présentent une diminution des taux circulants en IGF-1 et en leptine dès 10 jours de vie. Afin d'étudier le rôle de l'IGF-1, de la leptine et de l'insuline, trois hormones fortement régulées par la nutrition, nous avons tout d'abord vérifié un potentiel impact sur la survie des neurones à GHRH. Bien que l'insuline soit essentielle à la survie des explants en culture, le nombre de neurones à GHRH est identique quel que soit la nutrition, indiquant que la baisse de ces hormones n'impacterait pas ou peu l'ontogénie des neurones à GHRH. Afin d'étudier un éventuel impact sur la croissance axonale de ces neurones, nous avons ensuite réalisé des cultures d'explants issus de noyau arqué d'hypothalamus de souriceaux C57 Bl/6J âgés de 7 jours. Les explants ont ensuite été traités pendant 24H avec de l'IGF-1, de la leptine ou de l'insuline. L'analyse de la taille des axones montre que, chez les souris normalement nourries, l'IGF-1 stimule la croissance

axonale des neurones à GHRH de manière préférentielle. Cette action est réalisée par l'intermédiaire de son récepteur IGF-1R et de l'activation des deux voies de signalisations PI3K/AKT et MAPK. La leptine quant à elle, stimule la croissance axonale des neurones du noyau arqué de manière plus globale, incluant les neurones régulant la prise alimentaire (NPY/AgRP et POMC/CART) (Bouret, S. G. *et al.*, 2004) ainsi que les neurones à GHRH (travail de thèse). L'action stimulante de la leptine sur la croissance axonale des neurones à GHRH et des neurones régulant la prise alimentaire est cohérente avec le concept du DOHAD, et avec la reprogrammation du métabolisme au cours du développement en réponse à une restriction alimentaire. L'impact de l'insuline est plus limité puisque seule une concentration (1µM) permet d'induire une croissance axonale significative des neurones à GHRH, sûrement *via* l'IGF-1R.

Nous avons donc montré que l'IGF-1 et la leptine peuvent agir sur les neurones à GHRH et promouvoir leur croissance axonale. Les souris restreintes en période de lactation présentent un retard d'innervation de l'éminence médiane à 10 jours de vie. Cependant, l'innervation ne semble pas altérée au niveau latéral de l'éminence médiane à la différence du niveau médian. Cette observation suggère une hétérogénéité de la population de neurones à GHRH. Cette hétérogénéité peut être engendrée par différents facteurs comme l'âge des neurones et/ou leur localisation, l'environnement de l'éminence médiane (facteurs de croissance…) ou encore la sous-population de neurones à GHRH.

Concernant l'âge et/ou la localisation des neurones à GHRH, ceux-ci sont localisés tout le long du noyau arqué, et la mise en place de l'hypothalamus se fait selon un processus « outside-in ». De ce fait, les neurones à GHRH situés sur la partie latérale du noyau arqué sont plus âgés que les neurones à GHRH situés au niveau médian (Markakis, E. A., 2002; Caqueret, A. *et al.*, 2006). Dans ce sens, le défaut d'innervation de l'éminence médiane par les neurones à GHRH, observé à 10 jours de vie pourrait s'expliquer par une croissance axonale moins élevée des neurones situés au niveau médian et donc plus jeunes, tandis que les neurones plus âgés auraient déjà atteints leur cible. De la même façon, nous avons montré que les axones des neurones à GHRH semblaient réaliser une boucle dorso-postérieure pour rejoindre l'éminence médiane. Ainsi, les neurones à GHRH situés au niveau postérieur du noyau arqué pourraient être plus proches de leur cible que les neurones à GHRH situés à un niveau antérieur. Les neurones à GHRH localisés au niveau postérieur pourraient ainsi

atteindre l'éminence médiane plus rapidement, et être donc moins impactés par la diminution de la concentration en IGF-1 et en leptine induite par la restriction au cours de la lactation. Dans ce sens, il a été montré que l'action de la leptine sur les neurones régulant la prise alimentaire était différente en fonction du lieu de projections des neurones. En effet, les neurones à NPY/AgRP innervent tout le PVH en fonction de la concentration en leptine, les neurones αMSH innervant la partie latérale du PVH ne sont pas sensibles à la stimulation de la croissance axonale par la leptine (Bouyer, K. *et al.*, 2013). Afin de vérifier notre hypothèse, une immunohistochimie *in toto* sur les neurones à GHRH, suivie par une transparisation du cerveau selon le protocole de type 3DISCO (Erturk, A. *et al.*, 2012) seraient à réaliser. Cette expérience nous permettrait de suivre les neurones à GHRH grâce à une visualisation en 3 dimensions du cerveau. On pourrait ainsi détecter une potentielle différence de croissance axonale en fonction de la localisation neuronale, et ainsi détecter un potentiel impact différentiel de la restriction alimentaire en fonction de cette localisation.

L'impact de l'IGF-1 et de la leptine pourrait également varier en fonction de la sous-population de neurones à GHRH. En effet, ces neurones peuvent co-localiser avec la dopamine (DA), la galanine (GAL) et la neurotensine (TN) et la thyrosine hydroxylase (HT). Ces co-localisations de neurones sont situées majoritairement au niveau ventro-latéral du noyau arqué (Bouyer, K. *et al.*, 2007). De plus, certaines sous-populations de neurones à GHRH semblent être activées par l'hypoglycémie, ce qui suggère un lien entre l'hypoglycémie et la sécrétion de GH à rôle hyperglycémiant (Stanley, S. *et al.*, 2013). Un potentiel effet différentiel de l'IGF-1 ou de la leptine sur ces différentes sous populations neuronales n'est donc pas à négliger. Dans ce sens, il a été montré que l'IGF-1 pouvait stimuler la croissance axonale de certaines sous-populations neuronales comme les neurones corticaux (Ozdinler, P. H. *et al.*, 2006). Cependant, dans une autre étude, l'IGF-1 n'impacte pas la croissance axonale des motoneurones corticospinaux, ce qui suggère une réponse variable à l'IGF-1 en fonction de la sous-population neuronale et/ou des conditions d'expérimentations (Ozdinler, P. H. *et al.*, 2006; Hollis, E. R., 2nd *et al.*, 2009). De même, la leptine stimule la croissance des neurones régulant la prise alimentaire (Bouret, S. G. *et al.*, 2004), avec cependant un effet moindre sur les neurones αMSH (Bouyer, K. *et al.*, 2013). Afin de tester cette hypothèse, des cultures d'explants de noyaux arqués d'hypothalamus, avec un co-marquage GFP/GAL ou GFP/TN ou GFP/DA, nous permettraient de distinguer

d'éventuelles réponses différentes à la stimulation de la croissance axonale par l'IGF-1 ou la leptine.

Nous avons également montré que l'IGF-1 et la leptine n'étaient plus capables de stimuler la croissance axonale des neurones à GHRH suite à une restriction au cours de la lactation. Cette résistance implique une altération des capacités de phosphorylation d'AKT dans le cas de l'IGF-1. On peut supposer, que cette altération des capacités de phosphorylation d'AKT pourrait être engendrée par la PI3K. En effet, la PI3K, qui phosphoryle AKT, est composée d'une sous-unité régulatrice p85 et d'une sous unité catalytique p110 (Ito, Y. *et al.*, 2014). Il est à noter qu'il existe deux isoformes de la p85, la p85α et la p85β, dont les seuils d'activation sont différents. La p85α est la forme prédominante et est plus sensible à l'activation par IRS. Ainsi, il est possible que la restriction nutritionnelle durant la lactation induise l'utilisation de la p85β au détriment de la p85α qui serait moins présente, ce qui entrainerait une diminution de la phosphorylation d'AKT (Ueki, K. *et al.*, 2002). On peut également supposer qu'une diminution de l'activité de mTORC2 connu pour phosphoryler AKT pourrait engendrer la résistance observée (Mendoza, M. C. *et al.*, 2011). De plus, on pourrait également supposer une activité plus importante de PTEN, qui assure le maintien des niveaux de PIP3 bas et ainsi l'inactivation d'AKT, lors d'une restriction nutritionnelle.

La suite de ce projet sera d'étudier les mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer la résistance des neurones à GHRH issus de souriceaux restreints à la stimulation par la leptine. Pour cela, il serait nécessaire de stimuler les explants avec de la leptine afin d'étudier les capacités de phosphorylation des voies JAK/STAT mais également PI3K/AKT et MAPK. En effet, la leptine active les voies JAK/STAT, PI3K/AKT et MAPK (Fruhbeck, G., 2006). Les résultats pourront être vérifiés en réalisant des cultures d'explants stimulés à la leptine en présence d'un inhibiteur de JAK, comme le Ruxotilinib ou le Tofacitinib, suivi d'une immunohistochimie pour visualiser les neurones à GHRH. De même, l'utilisation d'inhibiteur de la voie PI3K/ AKT, LY_294002, ou d'inhibiteur de la voie Map-Kinase, PD_0325901, suite à un traitement à la leptine seraient également à envisager. Ces expériences nous permettraient de déterminer chez les souris normalement nourries les voies de signalisation impliquées, et de détecter un éventuel défaut des capacités de

phosphorylation de l'une des voies de signalisation chez les souris restreintes. Ces résultats nous permettraient de comprendre la résistance des neurones à la stimulation par la leptine, chez les souris restreintes en période postnatale précoce.

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant ultérieurement de tester s'il est possible de réaliser un sauvetage phénotypique des souriceaux restreints par une injection intrapéritonéale quotidienne d'IGF-1 et/ou de leptine au cours de la lactation (Bozdagi, O. *et al.*, 2013). En effet, les neurones à GHRH développent une résistance à l'IGF-1 et à la leptine à 7 jours de vie qui perdure *in vitro*. Ainsi un traitement en amont pourrait permettre de limiter les effets de la dénutrition sur la croissance axonale des neurones à GHRH, et potentiellement sur la programmation de la croissance. De plus, il a été montré que l'altération de la leptine néonatale engendrait une altération de la programmation de la prise alimentaire (Bouret, S. G., 2010). Ainsi, un traitement à la leptine pourrait prévenir les altérations métaboliques à l'âge adulte. En ce sens, un traitement par injection intrapéritonéale de leptine chez les souriceaux $Lep^{ob/ob}$ entre P4 et P14 restaure l'innervation du PVH par les neurones à NPY/AgRP et POMC/CART (Bouret, S. G. *et al.*, 2004; Bouyer, K. *et al.*, 2013).

Afin de déterminer la fenêtre de susceptibilité de programmation de l'axe somatotrope, l'impact d'une restriction en période anténatale a également été étudié. En effet, les neurones à GHRH commencent à se mettre en place au début de la 3ème semaine de gestation chez la souris (Burgunder, J. M., 1991). Un modèle de retard de croissance intra-utérin a donc été initié par une alimentation iso-calorique maternelle avec -40% de protéines. Par la suite, la taille des portées a été normalisée afin que les souriceaux soient restreints (RCIU-R), normalement nourris (RCIU-N) ou sur-nourris (RCIU-S) en période de lactation. Nos résultats suggèrent que le RCIU à lui seul ne semble pas altérer la programmation de l'axe somatotrope. En effet, les RCIU-N ont la même taille naso-anale que les contrôles. Cependant, le RCIU semble favoriser la susceptibilité aux pathologies métaboliques ultérieures (obésité chez les mâles dès P90, augmentation des tissus adipeux, foie…), ce qui est en accord avec le principe du DOHaD (Hattersley, A. T. *et al.*, 1999; Ozanne, S. E. *et al.*, 2002; Bateson, P. *et al.*, 2004). En effet, les mâles RCIU normalement nourris (RCIU-N) et les mâles et femelles RCIU sur-nourris (RCIU-S) présentent à l'âge adulte une augmentation de leur indice de masse corporelle, associée à une altération des données anthropométriques et

notamment à une augmentation du poids des tissus adipeux. Les RCIU-R mâles et femelles présentent une diminution de leur indice de masse corporelle et de leurs données anthropométriques ainsi qu'un poids du cerveau préservé comparativement au poids de la souris. Ces données suggèrent que le développement du cerveau a été partiellement préservé lors du développement. Dans l'ensemble, ces données suggèrent qu'une partie de la période postnatale précoce est impliquée dans ces altérations métaboliques. Ainsi, l'ensemble de la période périnatale apparait comme très susceptible à l'environnement nutritionnel concernant les pathologies métaboliques adultes. Par la suite, des analyses seront nécessaires afin d'étudier l'impact de l'environnement postnatal précoce sur ces souriceaux nés avec un RCIU. Par exemple, des études histologiques des différents tissus à 3 mois et à 1 an pourront être réalisées afin de détecter une éventuelle stéatose hépatique chez les souris RCIU-S et RCIU-N, ou au niveau des tissus adipeux afin d'étudier le nombre et la taille des adipocytes (Ong, K. K. *et al.*, 2000; Holzenberger, M. *et al.*, 2001). De plus, des analyses des pathologies à l'âge adulte seront également réalisées avec notamment des tests de tolérance au glucose ou à l'insuline, des mesures de la lipidémie ou encore des mesures de la pression artérielle. L'étude de la prise alimentaire avec des cages métaboliques serait également intéressante et nous permettrait d'observer une éventuelle hyperphagie des souris RCIU-N et RCIU-S. De plus, l'analyse du métabolisme énergétique par calorimétrie indirecte permettrait d'affirmer si l'augmentation de l'IMC est due à une dérégulation de la prise alimentaire et/ou du métabolisme énergétique. Les souris RCIU-R semblent quant à elles présenter moins de susceptibilité aux pathologies de type cardio-métabolique ultérieur en raison de l'absence de rattrapage rapide de la croissance, qui est connu pour augmenter cette susceptibilité. Leur étude permettrait d'étudier si un de ces paramètres en particulier est protégé lorsque l'on maintien des apports nutritionnels cohérents entre la période fœtale et postnatale précoce. En revanche, une bonne vitesse de croissance en période postnatale précoce est nécessaire au développement correct du cerveau (Alexeev, E. E. *et al.*, 2015). Ainsi, de potentielles altérations neurologiques chez les RCIU-R sont possibles. Dans ce sens, des tests des capacités d'apprentissage et de mémorisation, avec la piscine de Morris par exemple, seraient à prévoir. Ces résultats pourraient nous permettre d'optimiser la nutrition en période de lactation suite à un RCIU, afin d'allier capacités neurologiques et fonctions métaboliques.

De plus, il est important de noter que l'on observe un dimorphisme sexuel dans le phénotype induit par la restriction alimentaire au cours de la lactation. En effet, les mâles

semblent plus sensibles que les femelles aux altérations nutritionnelles en période postnatale précoce, avec une altération plus importante des courbes de croissance chez les mâles que chez les femelles. Plusieurs hypothèses peuvent être émises sur ce sujet.

La première hypothèse s'appuie sur l'hypoplasie hypophysaire permanente en cellules somatotropes présente chez les souris restreintes. Cette hypoplasie pourrait engendrer une possible altération du réseau fonctionnel des cellules somatotropes et donc une moins bonne coordination de sécrétion de GH comme observé dans le cas d'une ablation des neurones GHRH (Bonnefont, X. *et al.*, 2005). Cet impact serait d'autant plus important chez les mâles étant donné le profil de sécrétion pulsatile de la GH. En effet, les mâles présentent une pulsatilité de GH associée à de grands pics réguliers et séparés par de faibles concentrations, tandis que les femelles présentent des pics de moindres amplitudes plus rapprochés et une concentration basale plus importante (Farhy, L. S. *et al.*, 2002; Holt, R. I., 2002). Ainsi, une altération de l'organisation de l'hypophyse pourrait induire une altération de la sécrétion de GH plus importante chez les mâles par rapport aux femelles. De plus, on observe chez les femelles une stimulation directe par les œstrogènes des voies de signalisation activées par l'IGF-1R. Cela pourrait également contribuer à limiter les conséquences d'un éventuel défaut de sécrétion de GH.

La deuxième hypothèse concerne le dimorphisme sexuel des neurones à GHRH induit par le pic de testostérone néonatal (Chowen, J. A. *et al.*, 2004). En effet, il a été observé qu'en absence de ce pic, les souris mâles présentaient une féminisation de la pulsatilité de la GH. Inversement, une injection de testostérone néonatale chez les femelles engendre une masculinisation de la pulsatilité de leur sécrétion de GH. Ainsi, les stéroïdes sexuels pourraient être impliqués dans la programmation de l'axe somatotrope. Une conséquence pourrait être que les neurones à GHRH mâles répondent différemment par rapport aux neurones à GHRH femelles à la stimulation de leur croissance axonale par l'IGF-1.

Il serait intéressant d'étudier un éventuel impact différent chez les mâles et les femelles de la nutrition sur la programmation de l'axe somatotrope. Pour cela, nous pourrions étudier l'impact de l'IGF-1 sur la croissance axonale des neurones à GHRH issus de souris mâles et femelles séparément. En effet, jusqu'à présent les cultures d'explants ont été réalisées sur un mélange de souris mâles et femelles, afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel pour les expériences. Dans un premier temps, les rôles de l'IGF-1 et de la leptine sur des cultures d'explants de noyaux arqués de souris mâles et femelles normalement nourries

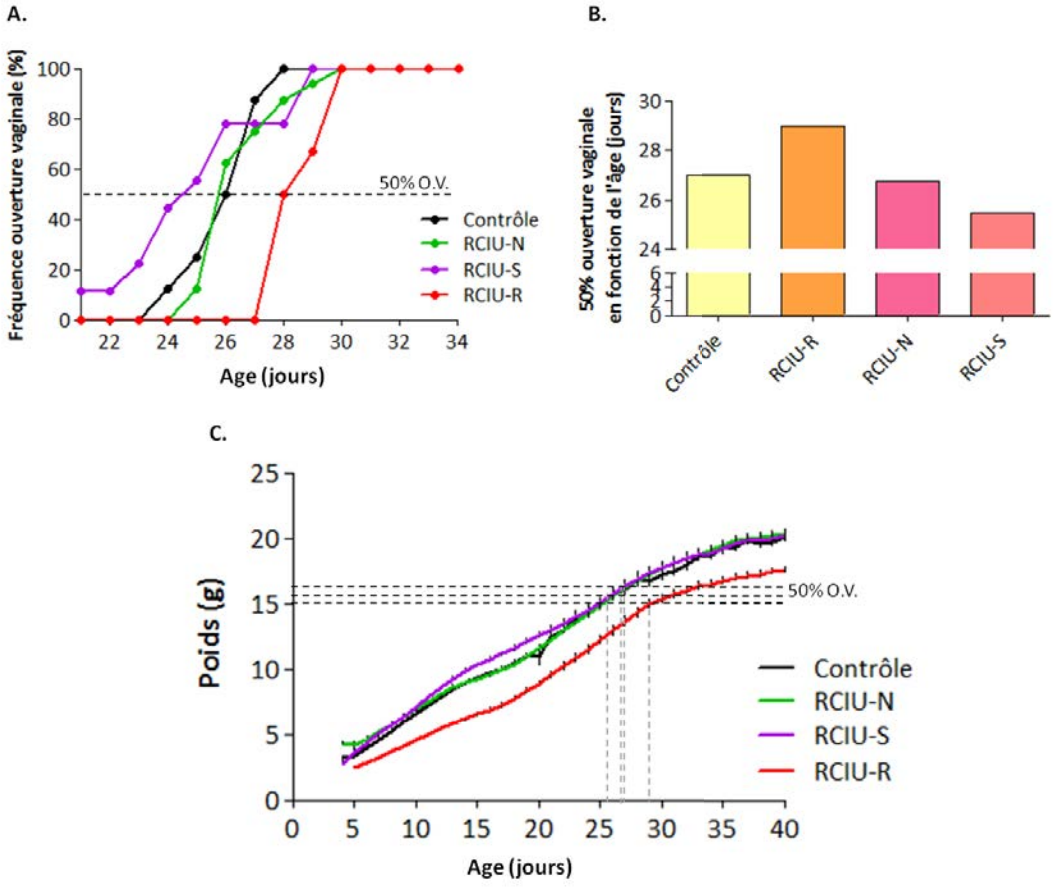

Figure 54 : Fréquence de l'ouverture vaginale des femelles RCIU. Les mesures sont réalisées sur les femelles nées avec un RCIU normalement nourries (contrôle), sur-nourries (RCIU-S), nourries normalement (RCIU-N) ou restreintes (RCIU-R) en période de lactation. Fréquence d'ouverture vaginale en fonction de l'âge **(A.)**, âge auquel 50% des femelles présentent une ouverture vaginale (50% ouverture vaginale (O. V.)) **(B.)**, 50% O.V. reporté sur le poids **(C.)**, n=6-16 par groupe.

seront à étudier. Dans un second temps, les cultures d'explants seront réalisées sur des souris restreintes en période de lactation, afin de détecter s'il existe un dimorphisme sexuel de l'impact de l'altération nutritionnelle sur les neurones à GHRH. Si de tels effets sont mis en évidence il serait alors également intéressant de réaliser dans un troisième temps les mêmes expériences sur des explants issus de mâles castrés à la naissance et sur des explants issus de femelles ayant subies une injection néonatale de testostérone. Ces expériences nous permettraient de confirmer le rôle de la testostérone sur la maturation postnatale précoce des neurones à GHRH, ainsi que sur le développement de l'axe somatotrope.

Durant ma thèse, j'ai pu observer que le développement de l'hypothalamus, qui est un centre intégrateur de l'organisme, semble très sensible aux facteurs environnementaux. L'hypothalamus régule plusieurs fonctions et grands axes neuroendocriniens. Afin de mettre en évidence d'éventuels défauts dans la mise en place de l'axe gonadotrope, la puberté des souris nées avec un RCIU a été observée par l'intermédiaire de l'ouverture vaginale, qui est un marqueur externe de puberté chez les femelles (Sanchez-Garrido, M. A. *et al.*, 2013). De manière intéressante, on observe que les souris RCIU-N ne présentent pas de différence par rapport aux souris contrôles **(Figure 54)**. En revanche, le rattrapage rapide de la croissance induit par une surnutrition (RCIU-S) engendre une ouverture vaginale plus précoce. Les souris maintenues en restriction (RCIU-R) ont quant à elles une puberté plus tardive que les souris contrôles. Ainsi, seule la nutrition en période postnatale précoce semble impacter la mise en place de la puberté chez les femelles. Ces résultats sont en accord avec les résultats observés chez l'Homme (Proos, L. *et al.*, 2012). Nous avons également reporté l'âge auquel 50% des souris ont débuté la puberté sur les courbes de poids (50% O.V.). Ces données permettent de mettre en évidence un poids, entre 15 et 17 grammes, qui permettrait l'initiation de la puberté (Sanchez-Garrido, M. A. *et al.*, 2013). Des analyses plus approfondies sur les cycles œstraux et sur l'expression des gènes impliqués dans l'axe gonadotrope seront nécessaires afin de comprendre ces modifications de fonctionnement de l'axe gonadotrope chez l'adulte.

De précédentes études ont associé les défauts de nutrition en période postnatale précoce avec des altérations de mise en place et de fonctionnement de l'axe gonadotrope (Leonhardt, M. *et al.*, 2003; Caron, E. *et al.*, 2012). Brièvement, au niveau de l'hypothalamus les neurones à GnRH, localisés dans l'aire préoptique, stimulent la sécrétion de LH et de FSH

des cellules gonadotropes adénohypophysaires. La LH et la FSH vont ensuite avoir une action sur les gonades (ovaires ou testicules) pour permettre la sécrétion de stéroïdes sexuels. Ces derniers vont notamment pouvoir agir sur les neurones à kisspeptine, localisés dans l'AVPV et dans le noyau arqué, pour réguler la sécrétion de GnRH et sa synthèse respectivement (d'Anglemont de Tassigny, X. *et al.*, 2010). Des altérations de la nutrition en période postnatale précoce ont notamment été associées avec des défauts d'innervation des neurones à GnRH par les neurones kisspeptinergiques du noyau arqué (Caron, E. *et al.*, 2012). Dans notre modèle de modification de la nutrition en période postnatale précoce, l'altération de l'axe gonadotrope sera donc à étudier. Une analyse de cet axe pourrait être réalisée par mesure de la durée des œstrus, mesure des taux de LH et FSH hypophysaires, ainsi que des concentrations circulantes en stéroïdes sexuels, et enfin analyse du nombre de follicules présents dans les ovaires. De plus, une analyse des capacités de reproduction sera également nécessaire, par mesure de la taille des portées et suivi de la survie néonatale. La continuité du projet RCIU donnera lieu à un autre projet de thèse. De manière intéressante, la leptine a été suggérée par l'équipe de Bouret comme stimulant la croissance axonale des neurones à kisspeptine (Caron, E. *et al.*, 2012). L'IGF-1 étant également fortement régulé par la nutrition, il pourrait aussi présenter un effet sur la croissance axonale de ces neurones à kisspeptine du noyau arqué. Il serait intéressant d'étudier directement le potentiel rôle de ces hormones sur la croissance axonale *in vitro* des neurones kisspeptinergiques localisés dans le noyau arqué à l'aide de cultures d'explants issus de souris normalement nourries. Par la suite, les mêmes expériences seraient à réaliser sur des explants issus de souris restreintes en période de lactation, afin de déterminer un potentiel impact de la restriction alimentaire, sur la réponse des neurones à kisspeptine à la stimulation de la croissance axonale par la leptine ou l'IGF-1.

BIBLIOGRAPHIE

Adamo, M., M. K. Raizada and D. LeRoith (1989). "Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system." Mol Neurobiol **3**(1-2): 71-100.

Ahima, R. S., C. Bjorbaek, S. Osei and J. S. Flier (1999). "Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development." Endocrinology **140**(6): 2755-2762.

Aiken, C. E. and S. E. Ozanne (2013). "Sex differences in developmental programming models." Reproduction **145**(1): R1-13.

Alexeev, E. E., B. Lonnerdal and I. J. Griffin (2015). "Effects of postnatal growth restriction and subsequent catch-up growth on neurodevelopment and glucose homeostasis in rats." BMC physiology **15**: 3.

Allan, G. J., D. J. Flint and K. Patel (2001). "Insulin-like growth factor axis during embryonic development." Reproduction **122**(1): 31-39.

Alvarez-Buylla, A. and R. A. Ihrie (2014). "Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain." Semin Cell Dev Biol **33**: 105-111.

Alvarez-Pedrerol, M., M. Guxens, M. Mendez, Y. Canet, R. Martorell, M. Espada, E. Plana, M. Rebagliato and J. Sunyer (2009). "Iodine levels and thyroid hormones in healthy pregnant women and birth weight of their offspring." European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies **160**(3): 423-429.

Andrew Sharman, J. L. (2016) "Vasopressin and its role in critical care." oxford Journal.

Arpa, J., I. Sanz-Gallego, J. Medina-Baez, L. V. Portela, L. B. Jardim, I. Torres-Aleman and J. A. Saute (2011). "Subcutaneous insulin-like growth factor-1 treatment in spinocerebellar ataxias: an open label clinical trial." Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society **26**(2): 358-359.

Asa, S. L. and S. Ezzat (2002). "The pathogenesis of pituitary tumours." Nature reviews. Cancer **2**(11): 836-849.

Atwal, J. K., B. Massie, F. D. Miller and D. R. Kaplan (2000). "The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase." Neuron **27**(2): 265-277.

Bach, L. A., P. Fu and Z. Yang (2013). "Insulin-like growth factor-binding protein-6 and cancer." Clinical science **124**(4): 215-229.

Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson and A. Efstratiadis (1993). "Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth." Cell **75**(1): 73-82.

Bale, T. L., T. Z. Baram, A. S. Brown, J. M. Goldstein, T. R. Insel, M. M. McCarthy, C. B. Nemeroff, T. M. Reyes, R. B. Simerly, E. S. Susser and E. J. Nestler (2010). "Early life programming and neurodevelopmental disorders." Biological psychiatry **68**(4): 314-319.

Balland, E., J. Dam, F. Langlet, E. Caron, S. Steculorum, A. Messina, S. Rasika, A. Falluel-Morel, Y. Anouar, B. Dehouck, E. Trinquet, R. Jockers, S. G. Bouret and V. Prevot (2014). "Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain." Cell metabolism **19**(2): 293-301.

Balland, E. and V. Prevot (2014). "[Tanycytes gate leptin transport into the hypothalamus]." Medecine sciences : M/S **30**(6-7): 624-627.

Balthasar, N., P. F. Mery, C. B. Magoulas, K. E. Mathers, A. Martin, P. Mollard and I. C. Robinson (2003). "Growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in GHRH-enhanced green fluorescent protein transgenic mice: a ventral hypothalamic network." Endocrinology **144**(6): 2728-2740.

Barker, D. J. (1995). "Fetal origins of coronary heart disease." Bmj **311**(6998): 171-174.

Barker, D. J. (1998). "In utero programming of chronic disease." Clinical science **95**(2): 115-128.

Barker, D. J. (2007). "The origins of the developmental origins theory." Journal of internal medicine **261**(5): 412-417.

Barsh, G. S. and M. W. Schwartz (2002). "Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration." Nature reviews. Genetics **3**(8): 589-600.

Bateson, P., D. Barker, T. Clutton-Brock, D. Deb, B. D'Udine, R. A. Foley, P. Gluckman, K. Godfrey, T. Kirkwood, M. M. Lahr, J. McNamara, N. B. Metcalfe, P. Monaghan, H. G. Spencer and S. E. Sultan (2004). "Developmental plasticity and human health." Nature **430**(6998): 419-421.

Baxter, R. C. (2014). "IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights." Nature reviews. Cancer **14**(5): 329-341.

Baxter, R. C., M. A. Binoux, D. R. Clemmons, C. A. Conover, S. L. Drop, J. M. Holly, S. Mohan, Y. Oh and R. G. Rosenfeld (1998). "Recommendations for nomenclature of the insulin-like growth factor binding protein superfamily." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **83**(9): 3213.

Beaudet, A., D. Greenspun, J. Raelson and G. S. Tannenbaum (1995). "Patterns of expression of SSTR1 and SSTR2 somatostatin receptor subtypes in the hypothalamus of the adult rat: relationship to neuroendocrine function." Neuroscience **65**(2): 551-561.

Beck, K. D., L. Powell-Braxton, H. R. Widmer, J. Valverde and F. Hefti (1995). "Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons." Neuron **14**(4): 717-730.

Beltrand, J. and C. Levy-Marchal (2008). "Pathophysiology of insulin resistance in subjects born small for gestational age." Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism **22**(3): 503-515.

Benarroch, E. E. (2007). "Thermoregulation: recent concepts and remaining questions." Neurology **69**(12): 1293-1297.

Benyshek, D. C., C. S. Johnston and J. F. Martin (2006). "Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life." Diabetologia **49**(5): 1117-1119.

Bernis, M. E., M. Oksdath, S. Dupraz, A. Nieto Guil, M. M. Fernandez, E. L. Malchiodi, S. B. Rosso and S. Quiroga (2013). "Wingless-type family member 3A triggers neuronal polarization via cross-activation of the insulin-like growth factor-1 receptor pathway." Front Cell Neurosci **7**: 194.

Berthoud, H. R. (2002). "Multiple neural systems controlling food intake and body weight." Neuroscience and biobehavioral reviews **26**(4): 393-428.

Bienvenu, G., D. Seurin, P. Grellier, P. Froment, M. Baudrimont, P. Monget, Y. Le Bouc and S. Babajko (2004). "Insulin-like growth factor binding protein-6 transgenic mice: postnatal growth, brain development, and reproduction abnormalities." Endocrinology **145**(5): 2412-2420.

Binoux, M. (1997). "GH, IGFs, IGF-binding protein-3 and acid-labile subunit: what is the pecking order?" European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies **137**(6): 605-609.

Blaess, S., N. Szabo, R. Haddad-Tovolli, X. Zhou and G. Alvarez-Bolado (2014). "Sonic hedgehog signaling in the development of the mouse hypothalamus." Front Neuroanat **8**: 156.

Bluet-Pajot, M. T., J. Epelbaum, D. Gourdji, C. Hammond and C. Kordon (1998). "Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion." Cellular and molecular neurobiology **18**(1): 101-123.

Bluet-Pajot, M. T., V. Tolle, P. Zizzari, C. Robert, C. Hammond, V. Mitchell, J. C. Beauvillain, C. Viollet, J. Epelbaum and C. Kordon (2001). "Growth hormone secretagogues and hypothalamic networks." Endocrine **14**(1): 1-8.

Bonnefont, X. (2010). "Circadian timekeeping and multiple timescale neuroendocrine rhythms." Journal of neuroendocrinology **22**(3): 209-216.

Bonnefont, X., A. Lacampagne, A. Sanchez-Hormigo, E. Fino, A. Creff, M. N. Mathieu, S. Smallwood, D. Carmignac, P. Fontanaud, P. Travo, G. Alonso, N. Courtois-Coutry, S. M. Pincus, I. C. Robinson and P. Mollard (2005). "Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(46): 16880-16885.

Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu and M. E. Greenberg (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." Science **286**(5443): 1358-1362.

Bouret, S. G. (2010). "Neurodevelopmental actions of leptin." Brain research **1350**: 2-9.

Bouret, S. G., S. J. Draper and R. B. Simerly (2004). "Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding." Science **304**(5667): 108-110.

Bouret, S. G., J. N. Gorski, C. M. Patterson, S. Chen, B. E. Levin and R. B. Simerly (2008). "Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats." Cell metabolism **7**(2): 179-185.

Bouret, S. G. and R. B. Simerly (2006). "Developmental programming of hypothalamic feeding circuits." Clinical genetics **70**(4): 295-301.

Bouret, S. G. and R. B. Simerly (2007). "Development of leptin-sensitive circuits." Journal of neuroendocrinology **19**(8): 575-582.

Bouyer, K., C. Loudes, I. C. Robinson, J. Epelbaum and A. Faivre-Bauman (2007). "Multiple co-localizations in arcuate GHRH-eGFP neurons in the mouse hypothalamus." Journal of chemical neuroanatomy **33**(1): 1-8.

Bouyer, K. and R. B. Simerly (2013). "Neonatal leptin exposure specifies innervation of presympathetic hypothalamic neurons and improves the metabolic status of leptin-deficient mice." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **33**(2): 840-851.

Bozdagi, O., T. Tavassoli and J. D. Buxbaum (2013). "Insulin-like growth factor-1 rescues synaptic and motor deficits in a mouse model of autism and developmental delay." Molecular autism **4**(1): 9.

Bradke, F. and C. G. Dotti (2000). "Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons." Current opinion in neurobiology **10**(5): 574-581.

Broglio, F., E. Arvat, A. Benso, C. Gottero, G. Muccioli, M. Papotti, A. J. van der Lely, R. Deghenghi and E. Ghigo (2001). "Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **86**(10): 5083-5086.

Brunet, A., S. R. Datta and M. E. Greenberg (2001). "Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway." Current opinion in neurobiology **11**(3): 297-305.

Bruning, J. C., D. Gautam, D. J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P. C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Muller-Wieland and C. R. Kahn (2000). "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction." Science **289**(5487): 2122-2125.

Bueno, M. P., D. Guadagnini, F. L. Goncalves, R. Barini, M. J. Saad, A. F. Schmidt and L. Sbragia (2010). "Assessment of the expression of IRbeta, IRS-1, IRS-2 and IGF-IRbeta in a rat model of intrauterine growth restriction." Fetal diagnosis and therapy **28**(3): 145-152.

Bur, I. M., A. M. Cohen-Solal, D. Carmignac, P. Y. Abecassis, N. Chauvet, A. O. Martin, G. T. van der Horst, I. C. Robinson, P. Maurel, P. Mollard and X. Bonnefont (2009). "The circadian clock components CRY1 and CRY2 are necessary to sustain sex dimorphism in mouse liver metabolism." The Journal of biological chemistry **284**(14): 9066-9073.

Burgunder, J. M. (1991). "Prenatal ontogeny of growth hormone releasing hormone expression in rat hypothalamus." Developmental neuroscience **13**(6): 397-402.

Caldji, C., B. Tannenbaum, S. Sharma, D. Francis, P. M. Plotsky and M. J. Meaney (1998). "Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(9): 5335-5340.

Campbell, D. S. and C. E. Holt (2003). "Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones." Neuron **37**(6): 939-952.

Campus National de Gynécologie Obstétrique, C. N. G. O. F. (2006). Retard de croissance Intra Utérin (RCIU). Item 21-Module 2. TICEM - UMVF.

Caqueret, A., F. Boucher and J. L. Michaud (2006). "Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus." Developmental biology **298**(1): 95-106.

Carlson, S. W., S. K. Madathil, D. M. Sama, X. Gao, J. Chen and K. E. Saatman (2014). "Conditional overexpression of insulin-like growth factor-1 enhances hippocampal neurogenesis and restores immature neuron dendritic processes after traumatic brain injury." Journal of neuropathology and experimental neurology **73**(8): 734-746.

Caron, E., P. Ciofi, V. Prevot and S. G. Bouret (2012). "Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function." J Neurosci **32**(33): 11486-11494.

Carson, M. J., R. R. Behringer, R. L. Brinster and F. A. McMorris (1993). "Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice." Neuron **10**(4): 729-740.

Chehab, F. F., K. Mounzih, R. Lu and M. E. Lim (1997). "Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin." Science **275**(5296): 88-90.

Chia, D. J., J. J. Young, A. R. Mertens and P. Rotwein (2010). "Distinct alterations in chromatin organization of the two IGF-I promoters precede growth hormone-induced activation of IGF-I gene transcription." Molecular endocrinology **24**(4): 779-789.

Chowen, J. A., L. M. Frago and J. Argente (2004). "The regulation of GH secretion by sex steroids." European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies **151 Suppl 3**: U95-100.

Cohen, P., C. Zhao, X. Cai, J. M. Montez, S. C. Rohani, P. Feinstein, P. Mombaerts and J. M. Friedman (2001). "Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity." The Journal of clinical investigation **108**(8): 1113-1121.

Cole, T. J., M. L. Ahmed, M. A. Preece, P. Hindmarsh and D. B. Dunger (2015). "The relationship between Insulin-like Growth Factor 1, sex steroids and timing of the pubertal growth spurt." Clinical endocrinology **82**(6): 862-869.

Collden, G., E. Balland, J. Parkash, E. Caron, F. Langlet, V. Prevot and S. G. Bouret (2015). "Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin." Molecular metabolism **4**(1): 15-24.

Collett-Solberg, P. F. and P. Cohen (2000). "Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system." Endocrine **12**(2): 121-136.

Connell, J. M., J. A. Whitworth, D. L. Davies, A. F. Lever, A. M. Richards and R. Fraser (1987). "Effects of ACTH and cortisol administration on blood pressure, electrolyte metabolism, atrial natriuretic peptide and renal function in normal man." Journal of hypertension **5**(4): 425-433.

Constancia, M., M. Hemberger, J. Hughes, W. Dean, A. Ferguson-Smith, R. Fundele, F. Stewart, G. Kelsey, A. Fowden, C. Sibley and W. Reik (2002). "Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth." Nature **417**(6892): 945-948.

Cosmi, E., T. Fanelli, S. Visentin, D. Trevisanuto and V. Zanardo (2011). "Consequences in infants that were intrauterine growth restricted." Journal of pregnancy **2011**: 364381.

Cottrell, E. C., M. S. Martin-Gronert, D. S. Fernandez-Twinn, J. Luan, L. M. Berends and S. E. Ozanne (2011). "Leptin-independent programming of adult body weight and adiposity in mice." Endocrinology **152**(2): 476-482.

Cottrell, E. C., J. G. Mercer and S. E. Ozanne (2010). "Postnatal development of hypothalamic leptin receptors." Vitam Horm **82**: 201-217.

Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdan, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone and M. J. Low (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus." Nature **411**(6836): 480-484.

Craft, S., L. D. Baker, T. J. Montine, S. Minoshima, G. S. Watson, A. Claxton, M. Arbuckle, M. Callaghan, E. Tsai, S. R. Plymate, P. S. Green, J. Leverenz, D. Cross and B. Gerton (2012). "Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnestic mild cognitive impairment: a pilot clinical trial." Archives of neurology **69**(1): 29-38.

d'Anglemont de Tassigny, X. and W. H. Colledge (2010). "The role of kisspeptin signaling in reproduction." Physiology **25**(4): 207-217.

Davies, J. S., D. A. Carter and T. Wells (2004). "Photic stimulation inhibits growth hormone secretion in rats: a hypothalamic mechanism for transient entrainment." Endocrinology **145**(6): 2950-2958.

DeChiara, T. M., A. Efstratiadis and E. J. Robertson (1990). "A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting." Nature **345**(6270): 78-80.

Demars, J. and C. Gicquel (2012). "Epigenetic and genetic disturbance of the imprinted 11p15 region in Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes." Clinical genetics **81**(4): 350-361.

Denis, R. G., A. Joly-Amado, E. Webber, F. Langlet, M. Schaeffer, S. L. Padilla, C. Cansell, B. Dehouck, J. Castel, A. S. Delbes, S. Martinez, A. Lacombe, C. Rouch, N. Kassis, J. A. Fehrentz, J. Martinez, P. Verdie, T. S. Hnasko, R. D. Palmiter, M. J. Krashes, A. D. Guler, C. Magnan and S. Luquet (2015). "Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons." Cell metabolism **22**(4): 646-657.

Desai, M., J. K. Jellyman and M. G. Ross (2015). "Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome." International journal of obesity **39**(4): 633-641.

Devnath, S. and K. Inoue (2008). "An insight to pituitary folliculo-stellate cells." Journal of neuroendocrinology **20**(6): 687-691.

Diez, H., J. J. Garrido and F. Wandosell (2012). "Specific roles of Akt iso forms in apoptosis and axon growth regulation in neurons." PloS one **7**(4): e32715.

Donahue, S. P. and L. S. Phillips (1989). "Response of IGF-1 to nutritional support in malnourished hospital patients: a possible indicator of short-term changes in nutritional status." The American journal of clinical nutrition **50**(5): 962-969.

Dournaud, P. and J. Epelbaum (1992). Somatostatine. Neuropeptides et neuromédiateurs. Sandoz.

Dubaquie, Y., D. L. Mortensen, A. Intintoli, D. A. Hogue, G. Nakamura, P. Rancatore, P. Lester, M. D. Sadick, E. Filvaroff, P. J. Fielder and H. B. Lowman (2001). "Binding protein-3-selective insulin-like growth factor I variants: engineering, biodistributions, and clearance." Endocrinology **142**(1): 165-173.

Dupraz, S., D. Grassi, D. Karnas, A. F. Nieto Guil, D. Hicks and S. Quiroga (2013). "The insulin-like growth factor 1 receptor is essential for axonal regeneration in adult central nervous system neurons." PloS one **8**(1): e54462.

Duron, E., B. Funalot, N. Brunel, J. Coste, L. Quinquis, C. Viollet, J. Belmin, P. Jouanny, F. Pasquier, J. M. Treluyer, J. Epelbaum, Y. le Bouc and O. Hanon (2012). "Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 in Alzheimer's disease." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **97**(12): 4673-4681.

Echelard, Y., D. J. Epstein, B. St-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J. A. McMahon and A. P. McMahon (1993). "Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity." Cell **75**(7): 1417-1430.

Erturk, A., K. Becker, N. Jahrling, C. P. Mauch, C. D. Hojer, J. G. Egen, F. Hellal, F. Bradke, M. Sheng and H. U. Dodt (2012). "Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO." Nature protocols **7**(11): 1983-1995.

Evdokimova, V., C. E. Tognon, T. Benatar, W. Yang, K. Krutikov, M. Pollak, P. H. Sorensen and A. Seth (2012). "IGFBP7 binds to the IGF-1 receptor and blocks its activation by insulin-like growth factors." Science signaling **5**(255): ra92.

Ezzat, S., S. Yu and S. L. Asa (2005). "The zinc finger Ikaros transcription factor regulates pituitary growth hormone and prolactin gene expression through distinct effects on chromatin accessibility." Molecular endocrinology **19**(4): 1004-1011.

Fall, C. H., A. N. Pandit, C. M. Law, C. S. Yajnik, P. M. Clark, B. Breier, C. Osmond, A. W. Shiell, P. D. Gluckman and D. J. Barker (1995). "Size at birth and plasma insulin-like growth factor-1 concentrations." Archives of disease in childhood **73**(4): 287-293.

Farhy, L. S., M. Straume, M. L. Johnson, B. Kovatchev and J. D. Veldhuis (2002). "Unequal autonegative feedback by GH models the sexual dimorphism in GH secretory dynamics." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology **282**(3): R753-764.

Fernandez, A. M. and I. Torres-Aleman (2012). "The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain." Nature reviews. Neuroscience **13**(4): 225-239.

Ferry, R. J., Jr., L. E. Katz, A. Grimberg, P. Cohen and S. A. Weinzimer (1999). "Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins." Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme **31**(2-3): 192-202.

Fiorotto, M. L., D. G. Burrin, M. Perez and P. J. Reeds (1991). "Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters." Am J Physiol **260**(6 Pt 2): R1104-1113.

Fontana, L., E. P. Weiss, D. T. Villareal, S. Klein and J. O. Holloszy (2008). "Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans." Aging cell **7**(5): 681-687.

Frasca, F., G. Pandini, P. Scalia, L. Sciacca, R. Mineo, A. Costantino, I. D. Goldfine, A. Belfiore and R. Vigneri (1999). "Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells." Molecular and cellular biology **19**(5): 3278-3288.

Froen, J. F., J. O. Gardosi, A. Thurmann, A. Francis and B. Stray-Pedersen (2004). "Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death." Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica **83**(9): 801-807.

Fruhbeck, G. (2006). "Intracellular signalling pathways activated by leptin." The Biochemical journal **393**(Pt 1): 7-20.

Garrison, J. L., E. Z. Macosko, S. Bernstein, N. Pokala, D. R. Albrecht and C. I. Bargmann (2012). "Oxytocin/vasopressin-related peptides have an ancient role in reproductive behavior." Science **338**(6106): 540-543.

Garza, J. C., M. Guo, W. Zhang and X. Y. Lu (2008). "Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro." The Journal of biological chemistry **283**(26): 18238-18247.

Gatford, K. L. and R. A. Simmons (2013). "Prenatal programming of insulin secretion in intrauterine growth restriction." Clinical obstetrics and gynecology **56**(3): 520-528.

Gay, E., D. Seurin, S. Babajko, S. Doublier, M. Cazillis and M. Binoux (1997). "Liver-specific expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth." Endocrinology **138**(7): 2937-2947.

George Paxinos, K. B. J. F. (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. second edition. A. Press.

Gicquel, C., A. El-Osta and Y. Le Bouc (2008). "Epigenetic regulation and fetal programming." Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism **22**(1): 1-16.

Gicquel, C. and Y. Le Bouc (2006). "Hormonal regulation of fetal growth." Hormone research **65 Suppl 3**: 28-33.

Giustina, A. and J. D. Veldhuis (1998). "Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human." Endocrine reviews **19**(6): 717-797.

Gluckman, P. D., A. J. Gunn, A. Wray, W. S. Cutfield, P. G. Chatelain, O. Guilbaud, G. R. Ambler, P. Wilton and K. Albertsson-Wikland (1992). "Congenital idiopathic growth hormone deficiency associated with prenatal and early postnatal growth failure. The International Board of the Kabi Pharmacia International Growth Study." The Journal of pediatrics **121**(6): 920-923.

Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004). "The developmental origins of the metabolic syndrome." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **15**(4): 183-187.

Gluckman, P. D. and M. A. Hanson (2004). "Living with the past: evolution, development, and patterns of disease." Science **305**(5691): 1733-1736.

Goldberg, J. L. (2003). "How does an axon grow?" Genes & development **17**(8): 941-958.

Gontier, G., C. George, Z. Chaker, M. Holzenberger and S. Aid (2015). "Blocking IGF Signaling in Adult Neurons Alleviates Alzheimer's Disease Pathology through Amyloid-beta Clearance." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **35**(33): 11500-11513.

Gonzalez-Parra, S., J. A. Chowen, L. M. Garcia Segura and J. Argente (1996). "Ontogeny of pituitary transcription factor-1 (Pit-1), growth hormone (GH) and prolactin (PRL) mRNA levels in male and female rats and the differential expression of Pit-1 in lactotrophs and somatotrophs." Journal of neuroendocrinology **8**(3): 211-225.

Goodman, T. and M. K. Hajihosseini (2015). "Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions." Frontiers in neuroscience **9**: 387.

Grattan, D. R. (2015). "60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis." The Journal of endocrinology **226**(2): T101-122.

Gupta, S., K. Mishra, A. Surolia and K. Banerjee (2011). "Suppressor of cytokine signalling-6 promotes neurite outgrowth via JAK2/STAT5-mediated signalling pathway, involving negative feedback inhibition." PloS one **6**(11): e26674.

Hajjari, M. and M. M. Jahani (2014). "H19: a long non-coding RNA with different roles in cancer progression." Gene Therapy and Molecular Biology **16**: 172-181.

Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis." Diabetologia **35**(7): 595-601.

Hales, C. N. and D. J. Barker (2001). "The thrifty phenotype hypothesis." British medical bulletin **60**: 5-20.

Hameed, S., C. N. Jayasena and W. S. Dhillo (2011). "Kisspeptin and fertility." The Journal of endocrinology **208**(2): 97-105.

Han, J., B. Wang, Z. Xiao, Y. Gao, Y. Zhao, J. Zhang, B. Chen, X. Wang and J. Dai (2008). "Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the neuronal differentiation of neural progenitors induced by insulin." Molecular and cellular neurosciences **39**(1): 118-124.

Hassouna, R., P. Zizzari, O. Viltart, S. K. Yang, R. Gardette, C. Videau, E. Badoer, J. Epelbaum and V. Tolle (2012). "A natural variant of obestatin, Q90L, inhibits ghrelin's action on food intake and GH secretion and targets NPY and GHRH neurons in mice." PloS one **7**(12): e51135.

Hattersley, A. T. and J. E. Tooke (1999). "The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease." Lancet **353**(9166): 1789-1792.

Herkenham, M. (2005). "Folliculo-stellate (FS) cells of the anterior pituitary mediate interactions between the endocrine and immune systems." Endocrinology **146**(1): 33-34.

Hideshi, K. Y., Yamaguchi; Haruko, Uemura (2012). Neural Regulation in the vertebrate endocrine system: neuroendocrine regulation.

Hodge, R. D., A. J. D'Ercole and J. R. O'Kusky (2004). "Insulin-like growth factor-I accelerates the cell cycle by decreasing G1 phase length and increases cell cycle reentry in the embryonic cerebral cortex." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **24**(45): 10201-10210.

Hodson, D. J., N. Romano, M. Schaeffer, P. Fontanaud, C. Lafont, T. Fiordelisio and P. Mollard (2012). "Coordination of calcium signals by pituitary endocrine cells in situ." Cell calcium **51**(3-4): 222-230.

Hoeflich, A., M. Wu, S. Mohan, J. Foll, R. Wanke, T. Froehlich, G. J. Arnold, H. Lahm, H. J. Kolb and E. Wolf (1999). "Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in transgenic mice reduces postnatal body weight gain." Endocrinology **140**(12): 5488-5496.

Hoermann, R., J. E. Midgley, R. Larisch and J. W. Dietrich (2015). "Homeostatic Control of the Thyroid-Pituitary Axis: Perspectives for Diagnosis and Treatment." Frontiers in endocrinology **6**: 177.

Hollis, E. R., 2nd, P. Lu, A. Blesch and M. H. Tuszynski (2009). "IGF-I gene delivery promotes corticospinal neuronal survival but not regeneration after adult CNS injury." Experimental neurology **215**(1): 53-59.

Holt, R. I. (2002). "Fetal programming of the growth hormone-insulin-like growth factor axis." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **13**(9): 392-397.

Holzenberger, M., J. Dupont, B. Ducos, P. Leneuve, A. Geloen, P. C. Even, P. Cervera and Y. Le Bouc (2003). "IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice." Nature **421**(6919): 182-187.

Holzenberger, M., G. Hamard, R. Zaoui, P. Leneuve, B. Ducos, C. Beccavin, L. Perin and Y. Le Bouc (2001). "Experimental IGF-I receptor deficiency generates a sexually dimorphic pattern of organ-specific growth deficits in mice, affecting fat tissue in particular." Endocrinology **142**(10): 4469-4478.

Hurtado-Chong, A., M. J. Yusta-Boyo, E. Vergano-Vera, A. Bulfone, F. de Pablo and C. Vicario-Abejon (2009). "IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone." The European journal of neuroscience **30**(5): 742-755.

Iglesias, P., C. Bayon, J. Mendez, P. G. Gancedo, C. Grande and J. J. Diez (2001). "Serum insulin-like growth factor type 1, insulin-like growth factor-binding protein-1, and insulin-like growth factor-binding protein-3 concentrations in patients with thyroid dysfunction." Thyroid : official journal of the American Thyroid Association **11**(11): 1043-1048.

Ikeda, N., H. Shoji, H. Suganuma, N. Ohkawa, M. Kantake, Y. Murano, K. Sakuraya and T. Shimizu (2015). "Effects of insulin-like growth factor-I during early postnatal period in intrauterine growth-restricted rats." Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society.

Ito, Y., J. R. Hart, L. Ueno and P. K. Vogt (2014). "Oncogenic activity of the regulatory subunit p85beta of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(47): 16826-16829.

Jaffe, C. A., B. Ocampo-Lim, W. Guo, K. Krueger, I. Sugahara, R. DeMott-Friberg, M. Bermann and A. L. Barkan (1998). "Regulatory mechanisms of growth hormone secretion are sexually dimorphic." The Journal of clinical investigation **102**(1): 153-164.

Jaworski, J., S. Spangler, D. P. Seeburg, C. C. Hoogenraad and M. Sheng (2005). "Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway." J Neurosci **25**(49): 11300-11312.

Jimenez-Chillaron, J. C., E. Isganaitis, M. Charalambous, S. Gesta, T. Pentinat-Pelegrin, R. R. Faucette, J. P. Otis, A. Chow, R. Diaz, A. Ferguson-Smith and M. E. Patti (2009). "Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice." Diabetes **58**(2): 460-468.

Joseph D'Ercole, A. and P. Ye (2008). "Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development." Endocrinology **149**(12): 5958-5962.

Kappeler, L., C. De Magalhaes Filho, J. Dupont, P. Leneuve, P. Cervera, L. Perin, C. Loudes, A. Blaise, R. Klein, J. Epelbaum, Y. Le Bouc and M. Holzenberger (2008). "Brain IGF-1 receptors control mammalian growth and lifespan through a neuroendocrine mechanism." PLoS Biol **6**(10): e254.

Kappeler, L., C. De Magalhaes Filho, P. Leneuve, J. Xu, N. Brunel, C. Chatziantoniou, Y. Le Bouc and M. Holzenberger (2009). "Early postnatal nutrition determines somatotropic function in mice." Endocrinology **150**(1): 314-323.

Karlberg, J. P., K. Albertsson-Wikland, E. Y. Kwan, B. C. Lam and L. C. Low (1997). "The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age." Hormone research **48 Suppl 1**: 17-24.

Kennett, J. E. and D. T. McKee (2012). "Oxytocin: an emerging regulator of prolactin secretion in the female rat." Journal of neuroendocrinology **24**(3): 403-412.

Khorram, O., M. Momeni, M. Desai and M. G. Ross (2007). "Nutrient restriction in utero induces remodeling of the vascular extracellular matrix in rat offspring." Reproductive sciences **14**(1): 73-80.

Kim, B., P. S. Leventhal, A. R. Saltiel and E. L. Feldman (1997). "Insulin-like Growth Factor-I-mediated Neurite Outgrowth in Vitro Requires Mitogen-activated Protein Kinase Activation." Journal of Biological Chemistry **272**(34): 21268-21273.

Kim, B., P. S. Leventhal, A. R. Saltiel and E. L. Feldman (1997). "Insulin-like growth factor-I-mediated neurite outgrowth in vitro requires mitogen-activated protein kinase activation." The Journal of biological chemistry **272**(34): 21268-21273.

Kirk, S. L., A. M. Samuelsson, M. Argenton, H. Dhonye, T. Kalamatianos, L. Poston, P. D. Taylor and C. W. Coen (2009). "Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring." PloS one **4**(6): e5870.

Kubzansky, L. D. and G. K. Adler (2010). "Aldosterone: a forgotten mediator of the relationship between psychological stress and heart disease." Neuroscience and biobehavioral reviews **34**(1): 80-86.

Laurino, L., X. X. Wang, B. A. de la Houssaye, L. Sosa, S. Dupraz, A. Caceres, K. H. Pfenninger and S. Quiroga (2005). "PI3K activation by IGF-1 is essential for the regulation of membrane expansion at the nerve growth cone." Journal of cell science **118**(Pt 16): 3653-3662.

Le Tissier, P. R., D. F. Carmignac, S. Lilley, A. K. Sesay, C. J. Phelps, P. Houston, K. Mathers, C. Magoulas, D. Ogden and I. C. Robinson (2005). "Hypothalamic growth hormone-releasing hormone (GHRH) deficiency: targeted ablation of GHRH neurons in mice using a viral ion channel transgene." Molecular endocrinology **19**(5): 1251-1262.

Le Tissier, P. R., D. J. Hodson, C. Lafont, P. Fontanaud, M. Schaeffer and P. Mollard (2012). "Anterior pituitary cell networks." Frontiers in neuroendocrinology **33**(3): 252-266.

Lee, C. C., C. C. Huang and K. S. Hsu (2011). "Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways." Neuropharmacology **61**(4): 867-879.

Leger, J. (1995) "RCIU: analyse de la croissance post natale et perspective thérapeutique par l'hormone de croissance."

Leng, G., R. Pineda, N. Sabatier and M. Ludwig (2015). "60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The posterior pituitary, from Geoffrey Harris to our present understanding." The Journal of endocrinology **226**(2): T173-185.

Leonhardt, M., J. Lesage, D. Croix, I. Dutriez-Casteloot, J. C. Beauvillain and J. P. Dupouy (2003). "Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty." Biology of reproduction **68**(2): 390-400.

Levy-Marchal, C., D. Jaquet and P. Czernichow (2004). "Long-term metabolic consequences of being born small for gestational age." Seminars in neonatology : SN **9**(1): 67-74.

Lewitt, M. S., M. S. Dent and K. Hall (2014). "The Insulin-Like Growth Factor System in Obesity, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus." Journal of clinical medicine **3**(4): 1561-1574.

Liu, C. M., E. M. Hur and F. Q. Zhou (2012). "Coordinating Gene Expression and Axon Assembly to Control Axon Growth: Potential Role of GSK3 Signaling." Frontiers in molecular neuroscience **5**: 3.

Liu, D., J. Diorio, B. Tannenbaum, C. Caldji, D. Francis, A. Freedman, S. Sharma, D. Pearson, P. M. Plotsky and M. J. Meaney (1997). "Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress." Science **277**(5332): 1659-1662.

Lonze, B. E., A. Riccio, S. Cohen and D. D. Ginty (2002). "Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB." Neuron **34**(3): 371-385.

Lopez-Bendito, G., A. Cautinat, J. A. Sanchez, F. Bielle, N. Flames, A. N. Garratt, D. A. Talmage, L. W. Role, P. Charnay, O. Marin and S. Garel (2006). "Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation." Cell **125**(1): 127-142.

Louvi, A., D. Accili and A. Efstratiadis (1997). "Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development." Developmental biology **189**(1): 33-48.

Luhmann, H. J., A. Fukuda and W. Kilb (2015). "Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA." Frontiers in cellular neuroscience **9**: 4.

MacKay, H. and A. Abizaid (2014). "Embryonic development of the hypothalamic feeding circuitry: Transcriptional, nutritional, and hormonal influences." Molecular metabolism **3**(9): 813-822.

Maggi, R., J. Zasso and L. Conti (2014). "Neurodevelopmental origin and adult neurogenesis of the neuroendocrine hypothalamus." Frontiers in cellular neuroscience **8**: 440.

Markakis, E. A. (2002). "Development of the neuroendocrine hypothalamus." Frontiers in neuroendocrinology **23**(3): 257-291.

Markus, A., T. D. Patel and W. D. Snider (2002). "Neurotrophic factors and axonal growth." Current opinion in neurobiology **12**(5): 523-531.

Markus, A., J. Zhong and W. D. Snider (2002). "Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth." Neuron **35**(1): 65-76.

Mazziotti, G. and A. Giustina (2013). "Glucocorticoids and the regulation of growth hormone secretion." Nature reviews. Endocrinology **9**(5): 265-276.

McArthur, S., I. C. Robinson and G. E. Gillies (2011). "Novel ontogenetic patterns of sexual differentiation in arcuate nucleus GHRH neurons revealed in GHRH-enhanced green fluorescent protein transgenic mice." Endocrinology **152**(2): 607-617.

McIntire, D. D., S. L. Bloom, B. M. Casey and K. J. Leveno (1999). "Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants." The New England journal of medicine **340**(16): 1234-1238.

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

Melmed, S. (2009). "Acromegaly pathogenesis and treatment." The Journal of clinical investigation **119**(11): 3189-3202.

Memberg, S. P. and A. K. Hall (1995). "Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin." J Neurobiol **27**(1): 26-43.

Mendoza, M. C., E. E. Er and J. Blenis (2011). "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." Trends in biochemical sciences **36**(6): 320-328.

Menendez-Castro, C., F. Fahlbusch, N. Cordasic, K. Amann, K. Munzel, C. Plank, R. Wachtveitl, W. Rascher, K. F. Hilgers and A. Hartner (2011). "Early and late postnatal myocardial and vascular changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction." PloS one **6**(5): e20369.

Mescher, A. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition. I. The McGraw-Hill Companies.

Mire, E., C. Mezzera, E. Leyva-Diaz, A. V. Paternain, P. Squarzoni, L. Bluy, M. Castillo-Paterna, M. J. Lopez, S. Peregrin, M. Tessier-Lavigne, S. Garel, J. Galceran, J. Lerma and G. Lopez-Bendito (2012). "Spontaneous activity regulates Robo1 transcription to mediate a switch in thalamocortical axon growth." Nature neuroscience **15**(8): 1134-1143.

Mire, E., N. Thomasset, L. B. Jakeman and G. Rougon (2008). "Modulating Sema3A signal with a L1 mimetic peptide is not sufficient to promote motor recovery and axon regeneration after spinal cord injury." Mol Cell Neurosci **37**(2): 222-235.

Modric, T., J. V. Silha, Z. Shi, Y. Gui, A. Suwanichkul, S. K. Durham, D. R. Powell and L. J. Murphy (2001). "Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor-binding protein-3 overexpression in transgenic mice." Endocrinology **142**(5): 1958-1967.

Moelling, K., K. Schad, M. Bosse, S. Zimmermann and M. Schweneker (2002). "Regulation of Raf-Akt Cross-talk." The Journal of biological chemistry **277**(34): 31099-31106.

Mollard, P., D. J. Hodson, C. Lafont, K. Rizzoti and J. Drouin (2012). "A tridimensional view of pituitary development and function." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **23**(6): 261-269.

Monk, D., R. Sanches, P. Arnaud, S. Apostolidou, F. A. Hills, S. Abu-Amero, A. Murrell, H. Friess, W. Reik, P. Stanier, M. Constancia and G. E. Moore (2006). "Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human." Human molecular genetics **15**(8): 1259-1269.

Mulvihill, M. J., A. Cooke, M. Rosenfeld-Franklin, E. Buck, K. Foreman, D. Landfair, M. O'Connor, C. Pirritt, Y. Sun, Y. Yao, L. D. Arnold, N. W. Gibson and Q. S. Ji (2009). "Discovery of OSI-906: a selective and orally efficacious dual inhibitor of the IGF-1 receptor and insulin receptor." Future Med Chem **1**(6): 1153-1171.

Murray, E., M. Fernandes, M. Fazel, S. H. Kennedy, J. Villar and A. Stein (2015). "Differential effect of intrauterine growth restriction on childhood neurodevelopment: a systematic review." BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology **122**(8): 1062-1072.

Musumeci, G., S. Castorina, P. Castrogiovanni, C. Loreto, R. Leonardi, F. C. Aiello, G. Magro and R. Imbesi (2015). "A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development." Acta histochemica **117**(4-5): 355-366.

Netchine, I., S. Azzi, Y. Le Bouc and M. O. Savage (2011). "IGF1 molecular anomalies demonstrate its critical role in fetal, postnatal growth and brain development." Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism **25**(1): 181-190.

Niblock, M. M., J. K. Brunso-Bechtold and D. R. Riddle (2000). "Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(11): 4165-4176.

Nieto-Estevez, V., C. Defterali and C. Vicario-Abejon (2016). "IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain." Frontiers in neuroscience **10**: 52.

Nunez, L., C. Villalobos, L. Senovilla and J. Garcia-Sancho (2003). "Multifunctional cells of mouse anterior pituitary reveal a striking sexual dimorphism." The Journal of physiology **549**(Pt 3): 835-843.

O'Kusky, J. and P. Ye (2012). "Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling." Frontiers in neuroendocrinology **33**(3): 230-251.

O'Kusky, J. R., P. Ye and A. J. D'Ercole (2000). "Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **20**(22): 8435-8442.

O'Kusky, J. R., P. Ye and A. J. D'Ercole (2003). "Increased expression of insulin-like growth factor I augments the progressive phase of synaptogenesis without preventing synapse elimination in the hypoglossal nucleus." The Journal of comparative neurology **464**(3): 382-391.

O'Malley, D., N. MacDonald, S. Mizielinska, C. N. Connolly, A. J. Irving and J. Harvey (2007). "Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology." Molecular and cellular neurosciences **35**(4): 559-572.

Oberbauer, A. M. (2013). "The Regulation of IGF-1 Gene Transcription and Splicing during Development and Aging." Frontiers in endocrinology **4**: 39.

Ojeda, S. R., A. Lomniczi and U. S. Sandau (2008). "Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion." Journal of neuroendocrinology **20**(6): 732-742.

Olivier, P., O. Baud, M. Bouslama, P. Evrard, P. Gressens and C. Verney (2007). "Moderate growth restriction: deleterious and protective effects on white matter damage." Neurobiology of disease **26**(1): 253-263.

Ong, K. K., M. L. Ahmed, P. M. Emmett, M. A. Preece and D. B. Dunger (2000). "Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study." Bmj **320**(7240): 967-971.

Ong, K. K., P. Emmett, K. Northstone, J. Golding, I. Rogers, A. R. Ness, J. C. Wells and D. B. Dunger (2009). "Infancy weight gain predicts childhood body fat and age at menarche in girls." J Clin Endocrinol Metab **94**(5): 1527-1532.

Orozco-Solis, R., L. Aguilar-Arnal, M. Murakami, R. Peruquetti, G. Ramadori, R. Coppari and P. Sassone-Corsi (2016). "The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure." Cell metabolism **23**(3): 467-478.

Otaegi, G., M. J. Yusta-Boyo, E. Vergano-Vera, H. R. Mendez-Gomez, A. C. Carrera, J. L. Abad, M. Gonzalez, E. J. de la Rosa, C. Vicario-Abejon and F. de Pablo (2006). "Modulation of the PI 3-kinase-Akt signalling pathway by IGF-I and PTEN regulates the differentiation of neural stem/precursor cells." Journal of cell science **119**(Pt 13): 2739-2748.

Ozanne, S. E. and C. N. Hales (2002). "Early programming of glucose-insulin metabolism." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **13**(9): 368-373.

Ozdinler, P. H. and J. D. Macklis (2006). "IGF-I specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motor neurons." Nature neuroscience **9**(11): 1371-1381.

Pandini, G., F. Frasca, R. Mineo, L. Sciacca, R. Vigneri and A. Belfiore (2002). "Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved." The Journal of biological chemistry **277**(42): 39684-39695.

Pelling, M., N. Anthwal, D. McNay, G. Gradwohl, A. B. Leiter, F. Guillemot and S. L. Ang (2011). "Differential requirements for neurogenin 3 in the development of POMC and NPY neurons in the hypothalamus." Developmental biology **349**(2): 406-416.

Perez-Martin, M., M. Cifuentes, J. M. Grondona, M. D. Lopez-Avalos, U. Gomez-Pinedo, J. M. Garcia-Verdugo and P. Fernandez-Llebrez (2010). "IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats." The European journal of neuroscience **31**(9): 1533-1548.

Pfenninger, K. H. (2009). "Plasma membrane expansion: a neuron's Herculean task." Nature reviews. Neuroscience **10**(4): 251-261.

Pfenninger, K. H., L. Laurino, D. Peretti, X. Wang, S. Rosso, G. Morfini, A. Caceres and S. Quiroga (2003). "Regulation of membrane expansion at the nerve growth cone." Journal of cell science **116**(Pt 7): 1209-1217.

Phelps, C. J., M. I. Romero and D. L. Hurley (2003). "Growth hormone-releasing hormone-producing and dopaminergic neurones in the mouse arcuate nucleus are independently regulated populations." Journal of neuroendocrinology **15**(3): 280-288.

Pinto, S., A. G. Roseberry, H. Liu, S. Diano, M. Shanabrough, X. Cai, J. M. Friedman and T. L. Horvath (2004). "Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin." Science **304**(5667): 110-115.

Pladys, P., Labarthe, C. (2003) "Le retard de croissance intra-utérin."

Platz, E. and R. Newman (2008). "Diagnosis of IUGR: traditional biometry." Seminars in perinatology **32**(3): 140-147.

Popken, G. J., R. D. Hodge, P. Ye, J. Zhang, W. Ng, J. R. O'Kusky and A. J. D'Ercole (2004). "In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system." The European journal of neuroscience **19**(8): 2056-2068.

Powell-Braxton, L., P. Hollingshead, C. Warburton, M. Dowd, S. Pitts-Meek, D. Dalton, N. Gillett and T. A. Stewart (1993). "IGF-I is required for normal embryonic growth in mice." Genes & development **7**(12B): 2609-2617.

Prevot, V., F. Langlet and B. Dehouck (2013). "Flipping the tanycyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain." Aging **5**(5): 332-334.

Proos, L. and J. Gustafsson (2012). "Is early puberty triggered by catch-up growth following undernutrition?" International journal of environmental research and public health **9**(5): 1791-1809.

Rajkumar, K., D. Barron, M. S. Lewitt and L. J. Murphy (1995). "Growth retardation and hyperglycemia in insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice." Endocrinology **136**(9): 4029-4034.

Ramon y Cayal, S. (1890). Sur l'origine et les ramifications des fibres nerveuses de la moelle embryonnaire. A. Anz. **5:85-95**.

Rhee, Y. H., M. Choi, H. S. Lee, C. H. Park, S. M. Kim, S. H. Yi, S. M. Oh, H. J. Cha, M. Y. Chang and S. H. Lee (2013). "Insulin concentration is critical in culturing human neural stem cells and neurons." Cell death & disease **4**: e766.

Rizzoti, K. and R. Lovell-Badge (2011). "Regenerative Medicine: Organ recital in a dish." Nature **480**(7375): 44-46.

Robins, S. C., I. Stewart, D. E. McNay, V. Taylor, C. Giachino, M. Goetz, J. Ninkovic, N. Briancon, E. Maratos-Flier, J. S. Flier, M. V. Kokoeva and M. Placzek (2013). "alpha-Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors." Nature communications **4**: 2049.

Rodriguez, E. M., J. L. Blazquez and M. Guerra (2010). "The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid." Peptides **31**(4): 757-776.

Romano, N., S. H. Yip, D. J. Hodson, A. Guillou, S. Parnaudeau, S. Kirk, F. Tronche, X. Bonnefont, P. Le Tissier, S. J. Bunn, D. R. Grattan, P. Mollard and A. O. Martin (2013). "Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **33**(10): 4424-4433.

Romo, A., R. Carceller and J. Tobajas (2009). "Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology." Pediatric endocrinology reviews : PER **6 Suppl 3**: 332-336.

Roseboom, T., S. de Rooij and R. Painter (2006). "The Dutch famine and its long-term consequences for adult health." Early human development **82**(8): 485-491.

Roseboom, T. J., J. H. van der Meulen, G. A. van Montfrans, A. C. Ravelli, C. Osmond, D. J. Barker and O. P. Bleker (2001). "Maternal nutrition during gestation and blood pressure in later life." Journal of hypertension **19**(1): 29-34.

Rosenberg, A. (2008). "The IUGR newborn." Seminars in perinatology **32**(3): 219-224.

Rosenbloom, A. L. (2007). "Physiologie de la croissance." Annales Nestlé **65**: 99-110.

Rosenbloom, A. L. (2007) "Physiologie de la croissance."

Russo, V. C., P. D. Gluckman, E. L. Feldman and G. A. Werther (2005). "The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain." Endocrine reviews **26**(7): 916-943.

Sainsbury, A. and H. Herzog (2001). "Inhibitory effects of central neuropeptide Y on the somatotropic and gonadotropic axes in male rats are independent of adrenal hormones." Peptides **22**(3): 467-471.

Salih, D. A., G. Tripathi, C. Holding, T. A. Szestak, M. I. Gonzalez, E. J. Carter, L. J. Cobb, J. E. Eisemann and J. M. Pell (2004). "Insulin-like growth factor-binding protein 5 (Igfbp5) compromises survival, growth, muscle development, and fertility in mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(12): 4314-4319.

Sanchez-Garrido, M. A., J. M. Castellano, F. Ruiz-Pino, D. Garcia-Galiano, M. Manfredi-Lozano, S. Leon, A. Romero-Ruiz, C. Dieguez, L. Pinilla and M. Tena-Sempere (2013). "Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges." Endocrinology **154**(9): 3387-3400.

Sato, Y., Z. Chen and K. Miyazaki (2007). "Strong suppression of tumor growth by insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1/tumor-derived cell adhesion factor/mac25." Cancer science **98**(7): 1055-1063.

Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-671.

Sciacca, L., R. Le Moli and R. Vigneri (2012). "Insulin analogs and cancer." Frontiers in endocrinology **3**: 21.

Scolnick, J. A., K. Cui, C. D. Duggan, S. Xuan, X. B. Yuan, A. Efstratiadis and J. Ngai (2008). "Role of IGF signaling in olfactory sensory map formation and axon guidance." Neuron **57**(6): 847-857.

Setia, S. and M. G. Sridhar (2009). "Changes in GH/IGF-1 axis in intrauterine growth retardation: consequences of fetal programming?" Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme **41**(11): 791-798.

Shimada, M. and T. Nakamura (1973). "Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei." Experimental neurology **41**(1): 163-173.

Shimogori, T., D. A. Lee, A. Miranda-Angulo, Y. Yang, H. Wang, L. Jiang, A. C. Yoshida, A. Kataoka, H. Mashiko, M. Avetisyan, L. Qi, J. Qian and S. Blackshaw (2010). "A genomic atlas of mouse hypothalamic development." Nature neuroscience **13**(6): 767-775.

Sjogren, K., J. O. Jansson, O. G. Isaksson and C. Ohlsson (2002). "A transgenic model to determine the physiological role of liver-derived insulin-like growth factor I." Minerva endocrinologica **27**(4): 299-311.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." Acta neuropathologica **119**(1): 7-35.

Soji, T., Y. Mabuchi, C. Kurono and D. C. Herbert (1997). "Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland." Microscopy research and technique **39**(2): 138-149.

Solloso, A., L. Barreiro, R. Seoane, E. Nogueira, C. Canibano, C. V. Alvarez, J. Zalvide, C. Dieguez and C. M. Pombo (2008). "GHRH proliferative action on somatotrophs is cell-type specific and dependent on Pit-1/GHF-1 expression." J Cell Physiol **215**(1): 140-150.

Sonigo, C., J. Bouilly, N. Carre, V. Tolle, A. Caraty, J. Tello, F. J. Simony-Conesa, R. Millar, J. Young and N. Binart (2012). "Hyperprolactinemia-induced ovarian acyclicity is reversed by kisspeptin administration." The Journal of clinical investigation **122**(10): 3791-3795.

Sosa, L., S. Dupraz, L. Laurino, F. Bollati, M. Bisbal, A. Caceres, K. H. Pfenninger and S. Quiroga (2006). "IGF-1 receptor is essential for the establishment of hippocampal neuronal polarity." Nature neuroscience **9**(8): 993-995.

Sousa-Ferreira, L., L. P. de Almeida and C. Cavadas (2014). "Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **25**(2): 80-88.

Spencer, S. J., M. A. Galic and Q. J. Pittman (2011). "Neonatal programming of innate immune function." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **300**(1): E11-18.

Stanley, S., A. I. Domingos, L. Kelly, A. Garfield, S. Damanpour, L. Heisler and J. Friedman (2013). "Profiling of Glucose-Sensing Neurons Reveals that GHRH Neurons Are Activated by Hypoglycemia." Cell metabolism **18**(4): 596-607.

Steculorum, S. M., G. Collden, B. Coupe, S. Croizier, S. Lockie, Z. B. Andrews, F. Jarosch, S. Klussmann and S. G. Bouret (2015). "Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits." The Journal of clinical investigation **125**(2): 846-858.

Steyn, F. J., V. Tolle, C. Chen and J. Epelbaum (2016). "Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone Secretion." Comprehensive Physiology **6**(2): 687-735.

Sun, L., A. A. Sadighi Akha, R. A. Miller and J. M. Harper (2009). "Life-span extension in mice by preweaning food restriction and by methionine restriction in middle age." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(7): 711-722.

Temmerman, L., E. Slonimsky and N. Rosenthal (2010). "Class 2 IGF-1 isoforms are dispensable for viability, growth and maintenance of IGF-1 serum levels." Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society **20**(3): 255-263.

Thissen, J. P., J. M. Ketelslegers and L. E. Underwood (1994). "Nutritional regulation of the insulin-like growth factors." Endocr Rev **15**(1): 80-101.

Torres-Aleman, I., F. Naftolin and R. J. Robbins (1990). "Trophic effects of basic fibroblast growth factor on fetal rat hypothalamic cells: interactions with insulin-like growth factor I." Brain research. Developmental brain research **52**(1-2): 253-257.

Torres-Aleman, I., F. Naftolin and R. J. Robbins (1990). "Trophic effects of insulin-like growth factor-I on fetal rat hypothalamic cells in culture." Neuroscience **35**(3): 601-608.

Tosh, D. N., Q. Fu, C. W. Callaway, R. A. McKnight, I. C. McMillen, M. G. Ross, R. H. Lane and M. Desai (2010). "Epigenetics of programmed obesity: alteration in IUGR rat hepatic IGF1 mRNA expression and histone structure in rapid vs. delayed postnatal catch-up growth." American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology **299**(5): G1023-1029.

Triebel, J., T. Bertsch, C. Bollheimer, D. Rios-Barrera, C. F. Pearce, M. Hufner, G. Martinez de la Escalera and C. Clapp (2015). "Principles of the prolactin/vasoinhibin axis." American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology **309**(10): R1193-1203.

Udagawa, J., R. Hashimoto, H. Suzuki, T. Hatta, Y. Sotomaru, K. Hioki, Y. Kagohashi, T. Nomura, Y. Minami and H. Otani (2006). "The role of leptin in the development of the cerebral cortex in mouse embryos." Endocrinology **147**(2): 647-658.

Ueki, I., G. T. Ooi, M. L. Tremblay, K. R. Hurst, L. A. Bach and Y. R. Boisclair (2000). "Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(12): 6868-6873.

Ueki, K., D. A. Fruman, S. M. Brachmann, Y. H. Tseng, L. C. Cantley and C. R. Kahn (2002). "Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival." Molecular and cellular biology **22**(3): 965-977.

Valerio, A., V. Ghisi, M. Dossena, C. Tonello, A. Giordano, A. Frontini, M. Ferrario, M. Pizzi, P. Spano, M. O. Carruba and E. Nisoli (2006). "Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3beta." The Journal of biological chemistry **281**(18): 12950-12958.

van Haeften, T. W. and T. B. Twickler (2004). "Insulin-like growth factors and pancreas beta cells." European journal of clinical investigation **34**(4): 249-255.

Vecchione, C., S. Colella, L. Fratta, M. T. Gentile, G. Selvetella, G. Frati, B. Trimarco and G. Lembo (2001). "Impaired insulin-like growth factor I vasorelaxant effects in hypertension." Hypertension **37**(6): 1480-1485.

Veening, J. G., T. R. de Jong, M. D. Waldinger, S. M. Korte and B. Olivier (2015). "The role of oxytocin in male and female reproductive behavior." European journal of pharmacology **753**: 209-228.

Vicario-Abejon, C., M. J. Yusta-Boyo, C. Fernandez-Moreno and F. de Pablo (2003). "Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **23**(3): 895-906.

Vickers, M. H., B. A. Ikenasio and B. H. Breier (2001). "IGF-I treatment reduces hyperphagia, obesity, and hypertension in metabolic disorders induced by fetal programming." Endocrinology **142**(9): 3964-3973.

Vijayakumar, A., S. Yakar and D. Leroith (2011). "The intricate role of growth hormone in metabolism." Frontiers in endocrinology **2**: 32.

Viollet, C., G. Lepousez, C. Loudes, C. Videau, A. Simon and J. Epelbaum (2008). "Somatostatinergic systems in brain: networks and functions." Molecular and cellular endocrinology **286**(1-2): 75-87.

Vogt, M. C., L. Paeger, S. Hess, S. M. Steculorum, M. Awazawa, B. Hampel, S. Neupert, H. T. Nicholls, J. Mauer, A. C. Hausen, R. Predel, P. Kloppenburg, T. L. Horvath and J. C. Bruning (2014). "Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding." Cell **156**(3): 495-509.

Waisman, A., F. Ginhoux, M. Greter and J. Bruttger (2015). "Homeostasis of Microglia in the Adult Brain: Review of Novel Microglia Depletion Systems." Trends in immunology **36**(10): 625-636.

Waite, E., C. Lafont, D. Carmignac, N. Chauvet, N. Coutry, H. Christian, I. Robinson, P. Mollard and P. Le Tissier (2010). "Different degrees of somatotroph ablation compromise pituitary growth hormone cell network structure and other pituitary endocrine cell types." Endocrinology **151**(1): 234-243.

Watanobe, H. and S. Habu (2002). "Leptin regulates growth hormone-releasing factor, somatostatin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone but not neuropeptide Y release in rat hypothalamus in vivo: relation with growth hormone secretion." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **22**(14): 6265-6271.

Weaver, I. C., I. C. Hellstrom, S. E. Brown, S. D. Andrews, S. Dymov, J. Diorio, T. Y. Zhang, M. Szyf and M. J. Meaney (2014). "The methylated-DNA binding protein MBD2 enhances NGFI-A (egr-1)-mediated transcriptional activation of the glucocorticoid receptor." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1652).

Wheatcroft, S. B. and M. T. Kearney (2009). "IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis." Trends in endocrinology and metabolism: TEM **20**(4): 153-162.

Wright, R. J., J. M. Holly, R. Galea, M. Brincat and H. D. Mason (2002). "Insulin-like growth factor (IGF)-independent effects of IGF binding protein-4 on human granulosa cell steroidogenesis." Biology of reproduction **67**(3): 776-781.

Xu, J., A. J. Bekaert, J. Dupont, S. Rouve, I. Annesi-Maesano, C. D. De Magalhaes Filho, L. Kappeler and M. Holzenberger (2011). "Exploring endocrine GH pattern in mice using rank plot analysis and random blood samples." The Journal of endocrinology **208**(2): 119-129.

Xu, J., G. Gontier, Z. Chaker, P. Lacube, J. Dupont and M. Holzenberger (2014). "Longevity effect of IGF-1R(+/-) mutation depends on genetic background-specific receptor activation." Aging Cell **13**(1): 19-28.

Yakar, S., J. Setser, H. Zhao, B. Stannard, M. Haluzik, V. Glatt, M. L. Bouxsein, J. J. Kopchick and D. LeRoith (2004). "Inhibition of growth hormone action improves insulin sensitivity in liver IGF-1-deficient mice." The Journal of clinical investigation **113**(1): 96-105.

Yeh, J. K., J. F. Evans, Q. T. Niu and J. F. Aloia (2006). "A possible role for melanocortin peptides in longitudinal growth." The Journal of endocrinology **191**(3): 677-686.

Yuan, H., R. Chen, L. Wu, Q. Chen, A. Hu, T. Zhang, Z. Wang and X. Zhu (2015). "The regulatory mechanism of neurogenesis by IGF-1 in adult mice." Molecular neurobiology **51**(2): 512-522.

Zha, J. and M. R. Lackner (2010). "Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy." Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research **16**(9): 2512-2517.

Zhang, M., M. C. Faugere, H. Malluche, C. J. Rosen, S. D. Chernausek and T. L. Clemens (2003). "Paracrine overexpression of IGFBP-4 in osteoblasts of transgenic mice decreases bone turnover and causes global growth retardation." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research **18**(5): 836-843.

Zik, J. B. and D. L. Roberts (2015). "The many faces of oxytocin: implications for psychiatry." Psychiatry research **226**(1): 31-37.

Zimmermann, M. B. (2012). "The effects of iodine deficiency in pregnancy and infancy." Paediatric and perinatal epidemiology **26 Suppl 1**: 108-117.

Zimmermann, M. B., P. L. Jooste, N. S. Mabapa, X. Mbhenyane, S. Schoeman, R. Biebinger, N. Chaouki, M. Bozo, L. Grimci and J. Bridson (2007). "Treatment of iodine deficiency in school-age children increases insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 concentrations and improves somatic growth." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **92**(2): 437-442.

Impact of perinatal nutrition on the programming of somatotropic axis

Nutrition during lactation in the early postnatal period programs the activity of the somatotropic axis (GH/IGF-1), which regulates body growth during postnatal development and plays an important role on adult metabolism. Then, an alteration of nutrition during this period permanently alters growth of mice and increases their susceptibility to develop cardiovascular and metabolic pathologies later in life. Mechanisms underlying this programming are thus of first importance for the life trajectory of the developing organism, and are in accordance with the DOHaD (developmental origins of health and disease). The goal of my work was to study the impact of nutrition during the perinatal period on the programming of the somatotropic axis.

First of all, I studied cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of GHRH neuronal development by nutrition during lactation (P1 to P16). Indeed, 10 days old restricted pups present decreased plasmatic level of IGF-1, leptin and insulin. At the same age, they also present a transient alteration of median eminence innervation by GHRH neurons associated with a decrease of the factor of proliferation and differentiation of somatotrophs cells, PIT1. This is followed by a permanent pituitary hypoplasia in somatotrophs cells (GH) by 20 days of age onward. The aim of my work was to decipher if nutrition through its three major effectors, IGF-1, leptin and insulin, could regulate the development of GHRH neurons. In this way, we setup an *in vitro* culture of arcuate nucleus explants from hypothalami of 7 days old pups. Results obtained from explants of normally fed pups indicate that IGF-1 preferentially stimulates axonal growth of GHRH neurons. Western blot analyses indicate that this stimulation is transmitted by the signaling pathway PI3K/AKT and MAPK. Leptin present a more global effect and is able to stimulate axonal growth of arcuate nucleus neurons, including GHRH and NPY/AgRP neurons. Insulin doesn't seem to stimulate axonal growth of arcuate nucleus neurons. Interestingly, GHRH neurons from restricted pups are resistant to the stimulation of axonal growth by IGF-1 or leptin. Regarding IGF-1, this resistance is associated with an alteration of phosphorylation capacities of the PI3K/AKT pathway, whereas those from IGF-1R and MAPK are not altered.

In a second part of my work, I initiated the study of malnutrition during the fetal period on the programming of the somatotropic axis to study its window of programming susceptibility. For this study we generated intrauterine growth retardation (IUGR) from $E_{15.5}$ with an isocaloric low protein diet (-40%). At birth, litter size were normalized to 3, 6, or 10 pups per dam in order to obtain overfed, normally fed or restricted pups during lactation. Our results indicate that IUGR doesn't seem to impact growth unless if it's associated with postnatal restriction. However, our results indicate that IUGR is associated with an increase in the body mass index after normal-feeding or over-feeding during lactation. These modifications are associated with an increase in fat mass portending metabolic alterations later on.

Impact de la nutrition périnatale sur la mise en place de l'axe somatotrope

La nutrition au cours de la période postnatale précoce programme l'activité de l'axe somatotrope à l'âge adulte (GH/IGF-1). Cet axe est impliqué dans la croissance staturo-pondérale en période postnatale et joue également un rôle important dans le métabolisme adulte. Une altération de la nutrition chez la souris au cours de la lactation (1er-16ème jour de vie) altère la croissance des souriceaux de façon permanente et augmente leurs susceptibilités à développer des pathologies cardio-métaboliques à l'âge adulte. Ces observations sont en accord avec le concept de l'origine développementale de la santé et des pathologies adultes (DOHaD). Durant ma thèse, j'ai étudié l'impact de la nutrition périnatale sur la mise en place de l'axe somatotrope. Dans un premier temps, j'ai étudié les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation du développement des neurones à GHRH par la nutrition durant la lactation. En effet, la restriction nutritionnelle des souriceaux au cours de la lactation par augmentation des portées à 10 petits par mère induit une diminution des taux plasmatiques en IGF-1, insuline et leptine à l'âge de 10 jours. Ceci est associé à une diminution transitoire de l'innervation de l'éminence médiane par les neurones à GHRH à 10 jours de vie et à une diminution de l'expression de Pit-1, facteur de prolifération et de différenciation des cellules somatotropes hypophysaire (GH^+). Ce retard d'innervation induit une hypoplasie hypophysaire permanente en cellules somatotropes dès 20 jours de vie. Les résultats obtenus à partir des cultures *in vitro* d'explants de noyaux arqués micro-disséqués à partir d'hypothalamus de souriceaux âgés de 7 jours normalement nourris indiquent que l'IGF-1 stimule de façon préférentielle la croissance axonale des neurones à GHRH. Les analyses par western blot indiquent que cette stimulation est transmise par les deux voies de signalisation PI3K/AKT et ERK/MAPK. La leptine présenterait quant à elle un effet plus global sur les neurones du noyau arqué, stimulant la croissance axonale des neurones à GHRH et des neurones orexigène à NPY/AgRP. De manière intéressante, nos données indiquent que les neurones à GHRH issus de souris restreintes sont résistants à la stimulation de la croissance axonale par l'IGF-1 ou la leptine. Concernant l'IGF-I, cette résistance est associée à une altération des capacités de phosphorylation de la voie PI3K/AKT, tandis que celles de l'IGF-1R et de la voie ERK/MAPK ne sont pas altérées.

Dans un deuxième temps, j'ai initié l'étude d'une dénutrition durant la période fœtale sur la mise en place de l'axe somatotrope afin de déterminer l'étendue de sa fenêtre de programmation. Pour cela, nous avons induit un retard de croissance intra-utérin à partir de la 3ème semaine de gestation chez des fœtus murins par une alimentation maternelle iso-calorique hypo-protéique (-40%). A la naissance, la taille des portées a été normalisée à 3, 6 ou 10 petits par mère afin d'induire respectivement une restriction, une nutrition normale ou une surnutrition en période de lactation. Nos résultats indiquent que le RCIU n'altère pas la croissance staturo-pondérale, sauf s'il est associé à une restriction nutritionnelle en période postnatale. Néanmoins, nos données indiquent que le RCIU est associé à une augmentation de l'indice de masse corporelle suite à une surnutrition ou une nutrition normale durant la lactation. Ces modifications sont associées à l'augmentation de tissus adipeux, ce qui laisse présager des altérations métaboliques à l'âge adulte.