



**THESE  
EN COTUTELLE INTERNATIONALE**



N°.....

N°...17...

*Présentée devant*

**L'Université de Bourgogne**  
UFR Sciences de la Vie et de la  
Santé, FRANCE

et

**L'Université d'Abomey-Calavi**  
Faculté des Sciences et  
Techniques, BENIN

**Pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne et de l'Université d'Abomey-Calavi**

*Mention Sciences de la Vie (Biologie et Physiologie Cellulaires)*

Par

**Jean-Marc ATEGBO**

Le 12 Novembre 2007

**Physiopathologie du diabète gestationnel  
et de la macrosomie: Rôle des cytokines, des  
adipokines, du statut antioxydant et de PPAR- $\alpha$**

**Composition du Jury:**

<i>Président:</i>	Professeur Gbéassor F. Messanvi	<i>Université de Lomé (Togo)</i>
<i>Rapporteur:</i>	Professeur Séri V. Bialli	<i>Université de Cocody (Côte d'Ivoire)</i>
<i>Rapporteur:</i>	Professeur Akpona A. Simon	<i>Université de Parakou (Bénin)</i>
<i>Examineur:</i>	Professeur Moutairou A. Kabirou	<i>Université d'Abomey-Calavi (Bénin)</i>
<i>Directeur de thèse:</i>	Professeur Khan A. Naim	<i>Université de Bourgogne (France)</i>

**Ce travail a été réalisé dans le cadre de la Formation des Formateurs de l'Université d'Abomey-Calavi, avec le soutien du Gouvernement du Bénin à travers le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, et de l'Accord Interuniversitaire Dijon-Cotonou, Université de Bourgogne/Université d'Abomey-Calavi, Accord soutenu par le Ministère Français des Affaires Etrangères, par le biais de l'Ambassade de France au Bénin-Cotonou**

**A mon père Samuel, in memoriam**

**A ma mère Elisabeth**

**A Asline, Arnould et Anicet**

**A Nicole**

## Remerciements

Les Recherches qui font l'objet de cette thèse ont été réalisées à l'Université de Bourgogne, au sein de l'UPRES EA 4183 "Lipides et Signalisation Cellulaire", sous la direction du Professeur Naim Akhtar KHAN et à l'Université d'Abomey-Calavi, au Département de Physiologie Animale, dirigé par le Professeur Karim L. DRAMANE.

A vous, **Professeur Naim A. Khan**, pour m'avoir accueilli et permis d'effectuer ce travail au sein de votre laboratoire. Je vous adresse mes sincères remerciements pour les compétences et qualités scientifiques et humaines que vous m'avez inculqués tout au long de ces trois années. Je tiens à vous remercier particulièrement pour votre soutien scientifique et matériel ainsi que pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de cette thèse. Votre permanente disponibilité, votre rigueur dans la mise en place des protocoles et votre capacité d'analyse des résultats expérimentaux ont abouti à la valorisation de mes travaux dans des revues scientifiques internationales de qualité. Merci aussi de m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreux congrès et colloques en France et d'avoir accepté de diriger cette thèse.

A vous, **Professeur Karim L. Dramane**, pour m'avoir enseigné les premières notions de physiologie dès mon premier cycle à la Faculté des Sciences et Techniques, pour avoir permis mon recrutement en tant qu'assistant stagiaire au Département de Physiologie Animale de l'Université d'Abomey-Calavi et pour avoir contribué à ma promotion en tant que Maître-assistant des Universités (*CAMES*). J'ai beaucoup appris de vous et je vous suis infiniment reconnaissant pour l'aide appréciable que vous m'avez apportée tout au long de ce parcours. J'aimerais également vous exprimer mes remerciements pour avoir donné votre avis favorable pour la co-direction de cette thèse et pour m'avoir aidé à conclure avec succès ce travail malgré les difficultés rencontrées. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

A vous **Professeur Kabirou A. Moutairou**, pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'être membre de ce jury de thèse. Je vous exprime également toute ma gratitude et ma reconnaissance pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe du



Professeur Naim A. Khan à Dijon. Je ne vous remercierai jamais assez pour vos conseils et pour votre assistance. Soyez assuré de mon grand respect.

A vous **Professeur Simon A. Akpona**, pour l'honneur que vous m'avez fait en acceptant d'être rapporteur de cette thèse et d'être membre de ce jury, malgré vos nombreuses occupations, me permettant ainsi de bénéficier de vos compétences scientifiques. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Au **Professeur Bialli V. Séri** pour m'avoir fait l'honneur de vous déplacer d'Abidjan (Côte d'Ivoire) et d'accepter d'être rapporteur de cette thèse, me permettant ainsi de bénéficier de vos compétences et connaissances, mais également pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, témoigné par les remarques détaillées dans votre rapport scientifique. Je vous souhaite la bienvenue et vous exprime ma respectueuse considération et ma sincère gratitude.

Au **Professeur Messanvi F. Gbéassor**, pour avoir fait le déplacement depuis Lomé (Togo) afin de présider ce jury de thèse, malgré vos multiples occupations, témoignant ainsi de l'intérêt que vous avez porté à ce mémoire. Bienvenue chez vous. Soyez assuré de mon grand respect et de ma profonde gratitude.

J'exprime également toute ma gratitude et ma reconnaissance aux **Docteurs Aziz Hichami et Josiane Prost**, pour leur encadrement de qualité au cours de ces années, ainsi que pour leurs compétences scientifiques et techniques dont ils m'ont fait bénéficier tout au long de mon séjour au laboratoire. Je vous remercie d'avoir accepté d'être membres du *Comité de suivi* de ma thèse.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'UPRES EA 4183 "Lipides et Signalisation Cellulaire" du Professeur Naim A. Khan aujourd'hui présents (**Anne-Marie, Virginie, Aurélie, Aude, Akadiri, Abdelghani, Eugène, Sana et Oussama**) pour leur soutien et leur bonne humeur.

Mes remerciements à tous mes **ami(e)s de Dijon** pour leur accueil, leur bonne humeur et leur gentillesse.

Je ne remercierai jamais assez tous **mes aînés et collègues de l'Université d'Abomey-Calavi** dont la liste serait longue à énoncer mais qui se reconnaîtront et singulièrement ceux des **Départements de Physiologie Animale et de Zoologie et Génétique de la Faculté des Sciences et Techniques**, pour m'avoir soutenu tout au long de ces années qui ont été parfois difficiles.

Je remercie bien évidemment **Diana, Yves-Léonel et Isabelle**, pour leur soutien qui ne m'a jamais fait défaut. Un grand merci du fond du cœur, car vous savez que vous avez beaucoup et que vous comptez beaucoup pour moi.

Je voudrais enfin remercier **Michel, Eliane, Moïse, Eric, Simon, Ghislaine et Romance**, pour avoir toujours été présents pour me soutenir dans les moments de joie et de peine et pour avoir toujours cru en moi. Que le lien fraternel qui nous lie puisse se raffermir davantage.

# SOMMAIRE

---

	Page
<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>PREMIERE PARTIE : GENERALITES</b> .....	6
<b>CHAPITRE 1 : Physiopathologie du diabète gestationnel et de la macrosomie</b> .....	7
<b>1. 1. Métabolisme du glucose</b> .....	7
1. 1. 1. Rappels physiologiques.....	7
1. 1. 2. Rôle de l'insuline.....	8
1. 1. 2. 1. Aspects généraux.....	8
1. 1. 2. 2. Régulation de l'insulinosécrétion.....	9
1. 1. 2. 3. Effets métaboliques de l'insuline.....	10
<b>1. 2. Métabolisme du glucose au cours d'une grossesse normale</b> .....	11
1. 2. 1. Modifications du métabolisme du glucose lors d'une grossesse normale.....	11
1. 2. 2. Insulinosécrétion et insulino-résistance.....	11
<b>1. 3. Diabète</b> .....	12
1. 3. 1. Diabète de type 1.....	12
1. 3. 2. Diabète de type 2.....	13
1. 3. 3. Diabète gestationnel.....	14
1. 3. 3. 1. Définition et critères diagnostiques.....	14
1. 3. 3. 2. Données épidémiologiques.....	16
1. 3. 3. 3. Facteurs de risque du diabète gestationnel.....	16
1. 3. 3. 4. Causes du diabète gestationnel.....	17
1. 3. 3. 5. Hypothèses physiopathologiques.....	17
1. 3. 3. 6. Conséquences du diabète gestationnel.....	18
1. 3. 4. Autres formes de diabète.....	22



<b>CHAPITRE 4 : PPAR et différenciation cellulaire</b> .....	52
<b>4. 1. Mécanismes moléculaires d'action des PPARs</b> .....	52
4. 1. 1. Régulation de la transcription.....	52
4. 1. 2. Distribution tissulaire des PPARs.....	54
4. 1. 3. Ligands naturels et synthétiques des PPARs.....	54
<b>4. 2. Rôles physiologiques des PPARs</b> .....	55
4. 2. 1. PPAR- $\alpha$ .....	55
4. 2. 2. PPAR- $\gamma$ .....	55
4. 2. 3. PPAR- $\beta$ .....	56
<b>4. 3. PPARs et inflammation</b> .....	56
<b>4. 4. Hypothèse d'implication de PPAR-<math>\alpha</math> dans le diabète gestationnel et la macrosomie</b> .....	57

**DEUXIEME PARTIE : Apports personnels**.....59

**Liste des Publications et Communications**.....60

**Publication n°1**.....63

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

- Objectif en Français.....63
- Article en Anglais.....64
- Résumé en Français.....71

**Publication n°2**.....72

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

- Objectif en Français.....72

- Article en Anglais.....	73
- Résumé en Français.....	81
<b>Publication n°3.....</b>	<b>82</b>
<b>Modifications physiologiques et immunologiques du diabète gestationnel et de la macrosomie: implication de la programmation <i>in utero</i> ?</b>	
- Objectif en Français.....	82
- Article en Français.....	83
- Résumé en Français.....	99
<b>Publication n°4.....</b>	<b>100</b>
<b>Peroxisome Prolifator-Activated Receptor-<math>\alpha</math> gene modulates pancreatic transcriptional factors and inflammation in adipose tissues in normal and hyperglycaemic mice</b>	
- Objectif en Français.....	100
- Article en Anglais.....	101
- Résumé en Français.....	137
<b>TROISIEME PARTIE : Discussion générale et Perspectives.....</b>	<b>138</b>
<b>1. Discussion générale.....</b>	<b>139</b>
<b>2. Perspectives.....</b>	<b>148</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>151</b>
<b>Publication n°5.....</b>	<b>152</b>
<b>Cassava enriched diet is not diabetogenic rather it aggravates diabetes in rats.</b>	
- Objectif en Français.....	152
- Article en Anglais.....	153

- Résumé en Français.....	162
<b>Publication n°6.....</b>	<b>163</b>
<b>Does Tropical or Malnutrition-Related Diabetes Mellitus (MRDM) still exist?</b>	
<b>A state of review.</b>	
- Objectif en Français.....	163
- Article en Anglais.....	164
- Résumé en Français.....	186
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>187</b>
<b>Résumé de la thèse.....</b>	<b>209</b>

# INTRODUCTION GENERALE



---

Le diabète est une maladie chronique complexe en expansion qui concerne des millions de personnes à risque dans le monde (King, 1996). Reconnu comme une priorité de santé publique par sa fréquence et son coût, il peut être la cause de complications graves (risques cardio-vasculaires et rénaux, complications rétiniennes, amputations des membres inférieurs...). Si autrefois, le diabète contribuait à la morbidité et à la mortalité observées dans les pays développés (King, 1996), aujourd'hui, les pays en développement n'en sont pas épargnés (Monteiro et coll., 1991 ; King et coll., 1998). En Afrique en général et au *Bénin* en particulier, la précarité des conditions de prise en charge des diabétiques ainsi que l'indigence socio-économique de ces derniers, constituent autant de freins à l'obtention d'une normoglycémie indispensable à la prévention des complications chez le diabétique.

A partir d'une prévalence mondiale du diabète chez l'adulte de 4,0% en 1995, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prévoit une augmentation à 5,4% en 2025 (King et coll., 1998), sensiblement identique dans les pays industrialisés et dans les pays en voie de développement. Le diabète de type 2 représente la quasi-totalité du diabète de l'adulte à l'échelle planétaire. Cette augmentation de 35% en 30 ans ne semble pas énorme à première vue. Pourtant, traduite en nombre de diabétiques, le chiffre doit passer de 135 à 300 millions entre 1995 et 2025. La prévalence est plus élevée actuellement dans les pays industrialisés et elle le restera, mais l'accroissement du nombre de diabétiques proviendra surtout des pays en développement où une augmentation de 171% est prévue, de 84 à 228 millions, alors que les pays industrialisés doivent connaître une augmentation de 41% seulement, de 51 à 72 millions. Ce contraste dans l'évolution du diabète de type 2 entre prévalence et nombre de patients tient à l'effet de la taille des populations dans les pays en développement. Ainsi, en 2025, plus de 75% des diabétiques de la planète résideront dans les pays en développement, contre 62% en 1995. Les pays ayant le plus de diabétiques sont déjà aujourd'hui, et seront encore en 2025, dans le même ordre : l'Inde, la Chine et les Etats-Unis d'Amérique (King et coll., 1998). Il est à noter qu'en Afrique, des formes particulières du diabète sont connues avec un contraste entre le milieu sahélo-saharien où le sexe féminin est le plus touché et le milieu sub-saharien où le sexe masculin est plus concerné (Sidibe, 2000).

En Afrique Noire, peu de véritables programmes nationaux de lutte contre le diabète sont disponibles. Au *Bénin*, le Ministère de la Santé Publique a exprimé, au travers du document «*Politique et Stratégie du Secteur Santé 1997-2001*», sa volonté de lutter contre le

diabète au même titre que contre les maladies transmissibles (Djrolo et coll., 2003). Pour mener à bien cette tâche et établir les bases d'un véritable programme, il est souhaitable de disposer de données de référence sur l'importance de l'affection au sein de nos populations.

Si les critères tels que l'âge de début du diabète, la présence ou non de symptômes caractéristiques d'obésité ou d'antécédents familiaux, la tendance spontanée à la cétose et l'existence d'un contexte d'auto-immunité permettent aisément de classer les diabétiques des pays développés tempérés *en type 1* (insulino-dépendant) ou *type 2* (non insulino-dépendant) (Keen, 1986), une proportion non négligeable des diabétiques des pays tropicaux en voie de développement reste inclassable sur la base de ces critères (Ahuja, 1965 ; West, 1980 ; Mohan et coll., 1992). Ces formes particulières de diabète ont fait naître le concept de « *diabète tropical* » qui a fait l'objet de plusieurs travaux (Ahuja, 1965 ; Mc Millan et coll., 1979 ; Nwokolo et coll., 1980 ; Rao, 1984).

A côté de ces formes traditionnelles connues de diabète, on peut également citer le *diabète gestationnel* qui est le plus fréquent désordre métabolique qui affecte 1-10% de toutes les grossesses (Gabbe, 1986). C'est généralement un phénomène temporaire qui apparaît pendant la grossesse, habituellement au second ou au troisième trimestre. Cependant, il pourrait causer des complications métaboliques non seulement à la mère mais aussi à l'enfant. Les complications majeures du diabète gestationnel comportent les désordres hypertensifs maternels, l'hypoglycémie néonatale, la jaunisse (ictère) et les traumatismes à la naissance incluant la dystocie des épaules (Coustan, 1997). L'effet le plus communément rapporté sur les nouveau-nés est la *macrosomie* "gros bébés", qui constitue l'un des facteurs qui pourrait contribuer à l'émergence de l'obésité infantile. ***Une étude récente menée au Bénin a révélé une prévalence de près de 5,2% chez des femmes obèses*** (Djrolo et coll., 2002).

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

1991 ; Therond et coll., 2000). De nombreuses études ont montré une augmentation des marqueurs du stress oxydatif au cours du diabète gestationnel (Nourooz-Zadeh et coll., 1995 ; Leinonen et coll., 1997), ainsi qu'une diminution des mécanismes de défense vis-à-vis des substances radicalaires (Opara et coll., 1999 ; Rehman et coll., 1999). ***Comment se présente le profil de ces vitamines et de ces enzymes antioxydants lors de cette pathologie?***

La plupart des anomalies lipidiques observées chez les nouveau-nés macrosomiques sont analogues à celles trouvées chez leurs mères diabétiques. Plusieurs auteurs (Cowett et coll., 1982 ; Merzouk et coll., 1999 ; 2000) ont montré que, chez des bébés macrosomiques nés de mères diabétiques, les concentrations en lipides, lipoprotéines et apo B100 sont plus élevées que celles des bébés contrôles nés de mères en bonne santé (Fowden, 1989 ; Kalkhoff, 1991).

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

Fort de ces différentes observations et pour répondre à ces questions, nous nous proposons de présenter notre thèse en trois parties :

La première partie de ce mémoire, consacrée aux généralités, comporte quatre chapitres. Dans le premier chapitre, nous présentons la physiopathologie du diabète gestationnel et de la macrosomie. Le second chapitre fait état du rôle des cytokines, des adipokines et du statut immunitaire lors de ces pathologies. Le troisième chapitre fait état des connaissances actuelles sur le statut antioxydant de ces patients et enfin le quatrième chapitre

fait le point sur l'implication de PPAR $\alpha$  dans la différenciation cellulaire et l'inflammation pendant le diabète gestationnel et la macrosomie.

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

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

# PREMIERE PARTIE: GENERALITES

---

# *Chapitre 1*

## *Physiopathologie du diabète gestationnel et de la macrosomie*

---

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

### **1.1. Métabolisme du glucose**

#### **1. 1. 1. Rappels physiologiques**

Le glucose est le substrat énergétique le plus rapidement utilisable par les cellules de l'organisme. Le taux de glycémie est déterminé par l'équilibre entre le glucose libéré dans le compartiment extracellulaire (apports exogènes, réserves endogènes) et le glucose consommé par les différents tissus de l'organisme. Le glucose ingéré lors d'un repas est absorbé au niveau de l'intestin grêle, puis passe dans le système porte jusqu'au foie où une partie (environ 30%) est captée par les hépatocytes puis métabolisée. Le reste (environ 70%), passe dans la circulation systémique pour être utilisé par des tissus périphériques, essentiellement les muscles. Entre les périodes de repas, des réserves endogènes de glucose permettent de fournir du sucre aux organes si nécessaire. Ces réserves sont essentiellement constituées dans le foie, car il contient du glycogène d'une part, et est capable de produire du glucose par la gluconéogenèse d'autre part. Le glycogène hépatique est une forme de stockage de glucose immédiatement mobilisable en cas de besoin tel un jeûne ou un exercice musculaire important. La gluconéogenèse quant à elle fournit du glucose endogène à partir de substrats

non glucidiques que sont le lactate pyruvate, les acides aminés et le glycérol, généralement lors de jeûne prolongé. Certains organes comme le foie, le muscle, et le tissu adipeux dépendent de l'insuline pour utiliser le glucose. D'autres, au contraire, peuvent assimiler le glucose sans insuline. Il s'agit du cerveau, de la médullaire rénale, de la rétine, et des hématies. Dans ces organes, l'utilisation du glucose est fonction du niveau de glycémie.

Plusieurs hormones interviennent dans la régulation du métabolisme glucidique. La seule hormone hypoglycémisante est l'insuline, qui stimule la synthèse de glycogène et de lipides, ainsi que le transport de glucose à l'intérieur des cellules. Par ailleurs, elle inhibe la gluconéogenèse et la glycogénolyse hépatique. Les autres hormones, au nombre de 4, sont hyperglycémisantes (Porcellati, 2003). Il s'agit du glucagon, des catécholamines, de l'hormone de croissance, et des glucocorticoïdes (Vella, 2003). Le glucagon augmente la production de glucose par le foie par le biais d'une stimulation de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse, et en diminuant la production de glycogène. Les catécholamines agissent en stimulant la libération de glycogène hépatique. L'hormone de croissance et l'IGF-1 (*insuline-like growth factor*) stimulent la production hépatique de glucose et réduisent son utilisation périphérique (Frystyk, 2003). Finalement, les glucocorticoïdes potentialisent les effets du glucagon et des catécholamines, et entraînent une insulino-résistance.

## **1. 1. 2. Rôle de l'insuline**

### **1. 1. 2. 1. Aspects généraux**

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

## 1. 1. 2. 2. Régulation de l'insulinosécrétion

Un pancréas humain normal sécrète 40 à 50 unités d'insuline par jour. La concentration basale d'insuline dans le sang lors de période de jeûne est d'environ 0,4 ng/ml (ou 69 pmol/l). Une dizaine de minutes après l'ingestion d'un repas, on observe une augmentation de la concentration sanguine périphérique d'insuline, qui atteint son pic après environ 30 à 45 minutes. Chez le sujet normal, il est rare que le taux d'insuline s'élève au-delà de 690 pmol/l après un repas. Par la suite, il y a une diminution assez rapide de la glycémie qui revient aux valeurs basales après 90 à 120 minutes environ. Plusieurs molécules stimulent la sécrétion de l'insuline. Le glucose représente le stimulus principal, mais certains acides aminés (arginine, leucine, lysine) ont aussi un effet stimulant direct. Il existe une sécrétion basale d'insuline (c'est-à-dire en l'absence de stimuli) en présence d'une glycémie normale, à savoir 4,4-5,6 mmol/l. Parmi les hormones, l'acétylcholine, le glucagon, l'hormone de croissance, et des hormones gastro-intestinales comme le VIP (*Vaso Intestinal Peptide*) et la gastrine favorisent l'insulinosécrétion. Au contraire, l'adrénaline, la noradrénaline et la somatostatine ont un effet inhibiteur direct sur la sécrétion de l'insuline.

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

L'action de l'insuline au niveau des tissus cibles se fait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (Stephen, 1995). De fait, l'action de l'insuline au niveau des cellules du tissu adipeux, du foie, et des muscles est médiée par l'interaction entre la molécule d'insuline et les récepteurs spécifiques, comme le GLUT-4 (Stephen, 1995). Une fois l'insuline liée à son récepteur, on assiste à un phénomène d'internalisation des récepteurs aboutissant à l'action même de l'insuline. Il apparaît clairement que des anomalies des récepteurs à l'insuline, que ce soit leur concentration, leur affinité ou les deux, vont affecter



l'action et l'effet de l'insuline. *Ainsi, au cours du phénomène de « down-regulation », on assiste à une diminution des récepteurs à l'insuline en présence de taux d'insuline chroniquement élevé. Les situations cliniques au cours desquelles on observe ce phénomène sont principalement l'obésité et l'hyperinsulinisme chronique d'origine exogène.*

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

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

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

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

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

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

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

### **1. 2. 2. Insulinosécrétion et insulino-résistance**

Durant la période initiale (premier trimestre) de la grossesse, la tolérance au glucose est normale, et la sensibilité périphérique à l'insuline du tissu musculaire de même que la production de glucose par le foie sont dans les limites de la norme. Toutefois, on observe une sécrétion d'insuline plus importante lors d'une charge orale en glucose. Bien que l'on n'en connaisse pas la cause, cette augmentation de l'insulinosécrétion participe, avec les autres hormones comme la progestérone, les oestrogènes et le cortisol, à une lipogenèse et un stockage de graisses (Butte, 2000). Malgré cette insulinosécrétion plus marquée, la glycémie reste quasiment normale, ce qui indique un certain degré d'insulino-résistance. Plus tard dans la grossesse, les taux d'insulinémie basale et post prandiale augmentent, et vont jusqu'à tripler lors du troisième trimestre (Catalano, 1994). Cette réduction de sensibilité à l'insuline s'expliquerait par l'ensemble des modifications hormonales durant la grossesse. Ainsi, la sensibilité des cellules change parallèlement à la croissance de l'unité foetoplacentaire et à l'élévation de certaines hormones comme le HCG (*Human Chorionic Gonadotropin*), la prolactine, le cortisol et la progestérone. Cette insulino-résistance permet au fœtus de profiter des nutriments de la période post prandiale. La conjugaison de ces deux phénomènes, l'insulino-résistance et l'hyperinsulinisme compensatoire, aboutit à maintenir la tolérance au

glucose dans les limites de la normale, bien que légèrement moins bonne que chez la femme non enceinte, tout en garantissant au fœtus des substrats énergétiques en suffisance.

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

### **1. 3. Diabète**

Le diabète est un syndrome de déséquilibre métabolique associé à des épisodes d'hyperglycémie en relation avec un déficit vrai ou relatif en sécrétion d'insuline, et/ou d'une diminution de son efficacité biologique. On a traditionnellement classé le diabète selon l'âge du malade lors du diagnostic ou du début des symptômes (« diabète juvénile »). Par la suite, à la fin des années 70, on a employé les termes de diabète insulino-dépendant (type 1) et non-insulino-dépendant (type 2) selon la dépendance d'une prise exogène d'insuline. Toutefois, il est clair que cette façon « thérapeutique » de classer le diabète est grossière, puisque le « type 2 » comprend un ensemble de situations cliniques qui ne correspondent simplement pas à la définition du diabète de type 1. Par ailleurs, avec la mise en évidence d'auto-anticorps pouvant avoir un rôle pathogène ou du moins déclenchant dans la maladie (Bach, 1994), il semblerait plus logique de classer le diabète selon des critères étiologiques.

#### **1. 3. 1. Diabète de type 1**

Il représente environ 10% des diabètes dans le monde occidental. Il s'agit d'un état insulino-prive qui amène à une situation de catabolisme extrême, affectant principalement le foie, les muscles et le tissu adipeux. Ainsi, on assiste à une dégradation anarchique des stocks

énergétiques et à une cétose. L'ensemble de ces altérations est réversible avec l'apport d'insuline. Sans entrer dans les détails de la génétique du diabète de type 1, l'ensemble des connaissances actuelles permet de dire qu'il est le résultat de l'agression d'un agent infectieux ou toxique environnemental au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas chez des individus génétiquement prédisposés (Cavan, 1992), résultant en une destruction immuno-médiée de ces cellules particulières pancréatiques. Ainsi, on a détecté des auto-anticorps circulants dirigés contre les cellules  $\beta$  chez plus de 80% de patients atteints de diabète de type 1, et aussi des anticorps anti-insuline et anti-GAD (*Glutamic Acid Decarboxylase antibodies*) (Thivolet, 2002). Le diabète de type 1 survient plus fréquemment chez l'enfant. Toutefois, chez l'adulte, une proportion non négligeable de diabète initialement diagnostiqué comme étant de type 2 se révèle en fait être de type 1 qui évolue à court terme vers une dépendance à l'insuline.

### 1. 3. 2. Diabète de type 2

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

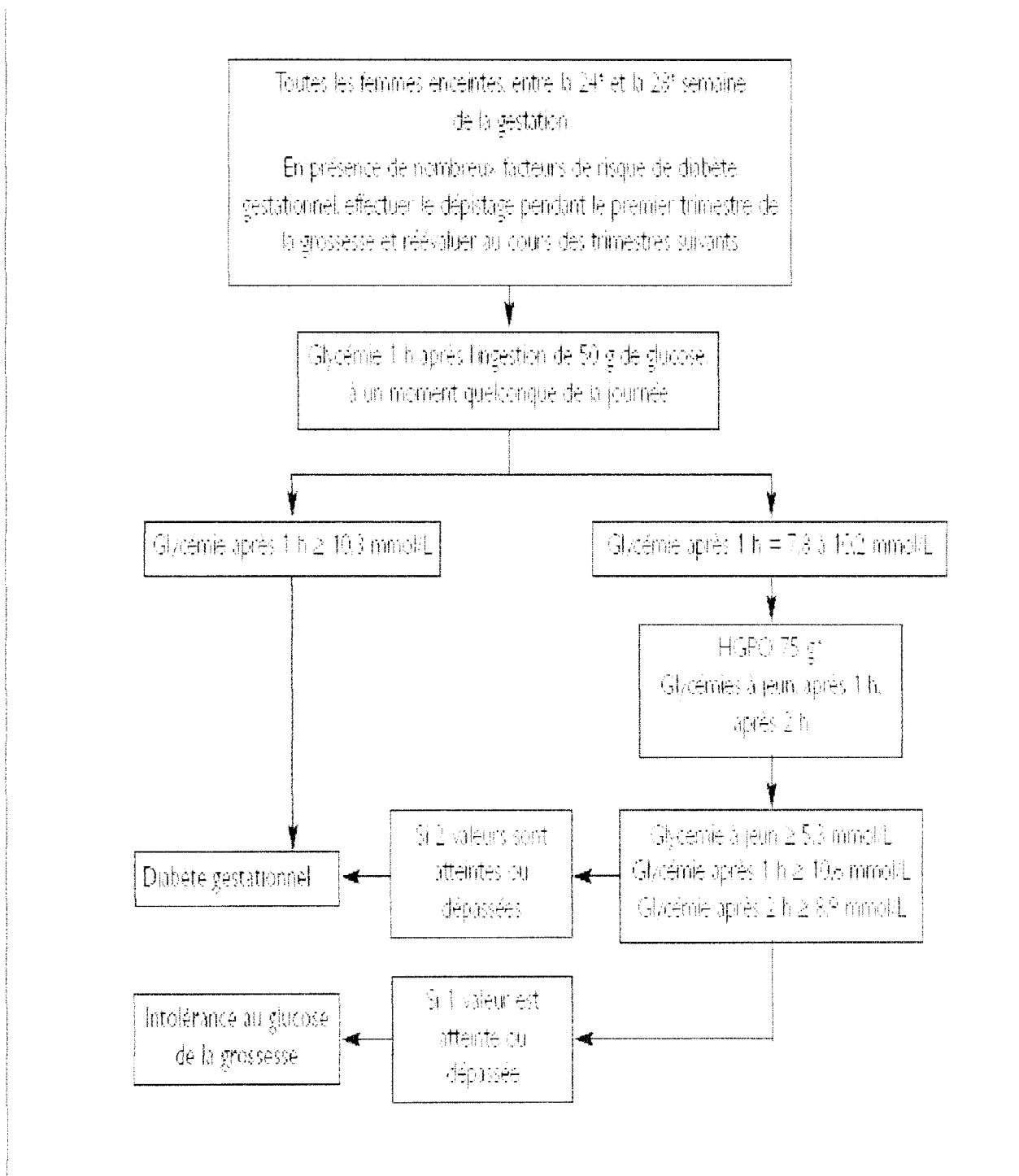
La traduction clinique du diabète - ou des diabètes -, est différente selon qu'il s'agit de diabète insulino-dépendant ou non insulino-dépendant. Ainsi, à un stade évolué, le diabète de type 1 est associé à un tableau clinique d'amaigrissement, de fonte musculaire, de fatigue, de cétoacidose débutante et de déshydratation. A un stade moins avancé, on observe les signes traduisant la carence en insuline que sont la perte de poids assez rapide, la fatigue anormale,

la polyurie et la polydipsie. Ce tableau clinique peut évoquer à tort une hyperthyroïdie. La présentation clinique du diabète de type 2 est habituellement asymptomatique, et le diagnostic se fait sur la présence d'une hyperglycémie. Parfois, cette anomalie biologique est associée à un certain degré de fatigue ou de polyurie, voire à une déshydratation évidente. Citons aussi quelques manifestations cliniques parfois révélatrices de la maladie : une candidose génitale, des lésions de folliculites, ou encore des troubles visuels en rapport avec l'hyperglycémie. (Tchobroutsky, 1987).

### **1. 3. 3. Diabète gestationnel**

#### **1. 3. 3. 1. Définition et critères diagnostiques**

Le diabète gestationnel (DG) est le trouble du métabolisme des hydrates de carbone le plus fréquent durant la grossesse (Catalano, 1994). De façon pragmatique, le DG se définit comme la présence d'un trouble de la tolérance aux hydrates de carbone qui survient ou qui est diagnostiqué durant la grossesse, et ce quel que soit le terme de la grossesse, le traitement institué et l'évolution dans le post partum (Verier-Mine, 1997) (**Figure1**). Il faut rappeler ici que la grossesse est un état diabétogène, caractérisée par une demande accrue en insuline, une augmentation des hormones diabétogènes et de l'insulinorésistance. Ces changements métaboliques et hormonaux assurent la survie du fœtus, mais contribuent aussi au développement du DG. Il faut souligner qu'en utilisant cette définition, le terme de diabète gestationnel inclut tant les femmes présentant une discrète intolérance aux hydrates de carbone que celles qui resteront diabétiques après l'accouchement. Cette définition somme toute assez grossière a l'inconvénient de regrouper des situations cliniques ayant chacune des caractéristiques propres, telle qu'un diabète de type 1 infra-clinique ou un diabète non insulino-dépendant diagnostiqué durant la grossesse. De plus, cette définition ne prend pas en compte l'importance de l'hyperglycémie, le risque maternel et foetal, ni ne précise les moyens diagnostiques à utiliser (Coustan, 1995). Malgré tout, même s'il existe des opinions diverses quant à sa détection et sa prise en charge, cette définition du DG a le mérite de sensibiliser les praticiens à cette pathologie liée à la grossesse et qui est associée à un risque pour la mère et pour l'enfant (Kjos, 1999).



\* En raison de la controverse qui existe au sujet des épreuves diagnostiques, d'autres méthodes acceptées peuvent être utilisées.

HGPO = hyperglycémie provoquée par voie orale.

**Figure 1 : Dépistage et diagnostic du diabète gestationnel**

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

### **1. 3. 3. 2. Données épidémiologiques**

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

### **1. 3. 3. 3. Facteurs de risque du diabète gestationnel**

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

Le rôle de l'obésité comme facteur affectant le métabolisme des hydrates de carbone a été étudié par Catalano et coll., (1999). Dans cette étude prospective comparant le

métabolisme du glucose chez des femmes obèses qui développaient ou non un DG, on remarquait que les femmes avec DG présentaient un type de réponse au test insulinique semblable aux résultats obtenus chez les diabétiques de type 2. De fait, ces femmes sont effectivement à risque de développer ultérieurement un diabète de type 2.

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

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

#### **1. 3. 3. 5. Hypothèses physiopathologiques**

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

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



moléculaire à la physiopathologie du DG. Une diminution de la phosphorylation de la tyrosine de la sous-unité  $\beta$  du récepteur à l'insuline fait partie de ces anomalies du transport du glucose chez les femmes atteintes de DG (Friedman, 1999).

#### **1. 3. 3. 5. 2. Trouble de la sécrétion pancréatique**

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

#### **1. 3. 3. 5. 3. Auto-immunité**

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

#### **1. 3. 3. 6. Conséquences du diabète gestationnel**

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

#### 1. 3. 3. 6. 1. *Risques pour la mère durant la grossesse*

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

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

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

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

*de complications foetales, et d'autre part bien sûr à assurer un équilibre glycémique à la mère* (Landon, 1985 ; Jensen et coll., 2000).

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

### **1. 3. 3. 6. 3. Récidive de diabète gestationnel lors de grossesse ultérieure**

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

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

#### 1. 3. 3. 6. 4. *Diabète gestationnel et risque ultérieur de diabète pour la mère*

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

\* *facteurs potentiellement modulables*: l'obésité ou la prise de poids après la grossesse, l'exercice physique et l'hygiène alimentaire, la survenue d'une nouvelle grossesse semblent être des facteurs de risque importants à développer un diabète ultérieurement (Peters, 1996).

\* *facteurs non modulables*: ils sont représentés par l'appartenance ethnique, l'anamnèse familiale de diabète, le degré d'obésité au cours de la grossesse, l'importance de la perturbation du métabolisme glucidique durant la grossesse (y compris nécessité d'une insulinothérapie), le métabolisme glucidique dans le post-partum.

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

### 1. 3. 3. 6. 5. *Conséquences à long terme du diabète gestationnel chez l'enfant*

Les conséquences immédiates du DG pour l'enfant comprennent les malformations congénitales, la macrosomie, et les modifications métaboliques (hypoglycémie, hypocalcémie, hyperbilirubinémie, polyglobulie). A long terme, les complications à redouter sont le développement d'une obésité et d'un diabète. Le risque accru de devenir obèse pour un enfant né de mère diabétique trouve une explication dans l'influence de l'environnement foetal sur sa croissance et son équilibre glycémique. Ceci a été démontré chez l'animal né de mère rendue «diabétique» par une alimentation riche en hydrates de carbone et qui développait ultérieurement un diabète et une obésité malgré un poids de naissance normal (Satyaprasad et coll., 1995). Chez l'homme, des études chez les Indiens Pima ont également montré que le risque de devenir obèse à l'adolescence était plus grand chez les enfants nés de mères diabétiques et qui avaient un poids de naissance élevé par rapport aux enfants de mères non diabétiques (58 vs 17%) (Pettitt et coll., 1983). Dans une population plus générale, les mêmes auteurs ont observé une corrélation entre la glycémie à 2 heures de l'HGPO pendant la grossesse et l'apparition d'une obésité chez les enfants (Pettitt et coll., 1988).

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

### 1. 3. 4. **Autres formes de diabète**

D'autres formes de diabète ont été individualisées, parmi lesquelles le ***diabète de type Mody (Maturity Onset Diabetes of Young*** ou diabète de type adulte chez le jeune) occupe une place particulière. Il s'agit d'un diabète monogénique, c'est-à-dire dû à la présence d'une seule anomalie génétique, à l'inverse des autres formes de diabète pour lesquelles on ne connaît que

des gènes de prédisposition multiples, insuffisants à eux seuls pour provoquer la maladie. Le diabète de type *Mody* a été initialement défini par un diabète de survenue précoce (classiquement avant l'âge de 25 ans), non insulino-dépendant, au moins dans les premières années suivant le diagnostic, survenant suite à une transmission autosomique dominante, ce qui signifie qu'il atteint statistiquement la moitié des sujets de chaque génération d'une famille dans les deux sexes.

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

---

## Chapitre 2

---

### *Cytokines, adipokines et système immunitaire*

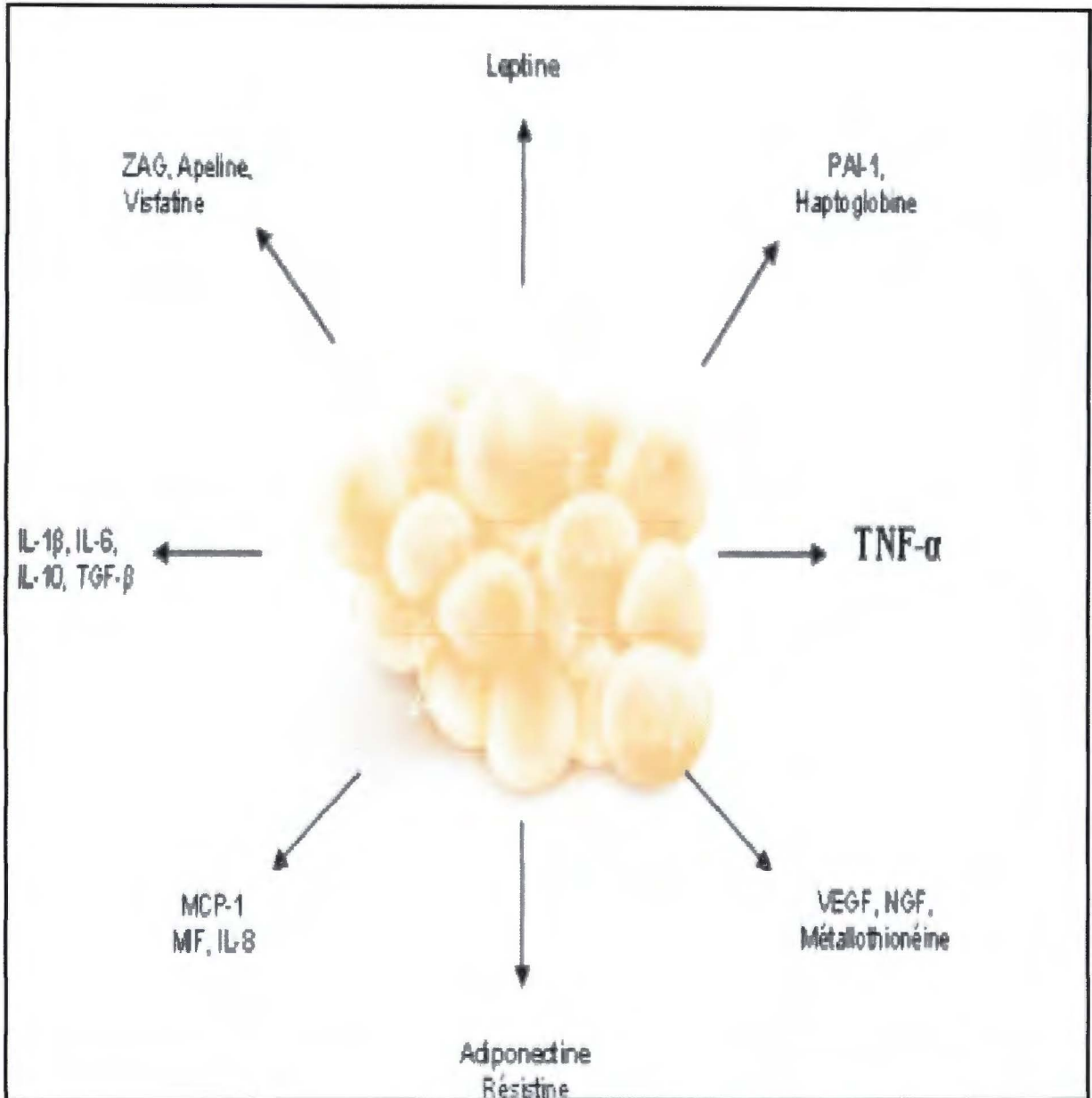
---

#### **2. 1. Tissu adipeux comme glande endocrine**

Pendant longtemps, le TA (Tissu Adipeux) a été considéré comme un simple tissu de stockage emmagasinant les graisses (triglycérides) en périodes d'abondance et les libérant (acides gras) lors de périodes de jeûne. Il est bien clair maintenant que ce tissu joue le rôle d'organe endocrine en plus de son rôle important dans le métabolisme énergétique (**Figure 2**).

Une étape majeure dans la reconnaissance du rôle sécrétoire du TA blanc est arrivée dans les années 90 avec la découverte de l'expression du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) par ce tissu (Hotamisligil et coll., 1993), expression augmentant avec l'obésité. Cette cytokine joue un rôle important dans l'induction de l'insulinorésistance (Hotamisligil et coll., 1995). En plus, le TNF- $\alpha$  a des effets sur le métabolisme des adipocytes tels que la stimulation de la lipolyse et l'apoptose (Prins et coll., 1997 ; Gasic, 1999 ; Trayhum et coll., 2006). Il est à noter que les macrophages qui ont infiltrés le TA sont la source majeure de TNF- $\alpha$  produit par ce tissu (Fantuzzi, 2005).

Le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine 6 (IL-6) sont des cytokines identifiées à l'origine comme des molécules pro-inflammatoires. Le TNF- $\alpha$ , produit par les macrophages et les lymphocytes, a de nombreux effets : antitumoral, procoagulant, anorexigène et pyrogène. L'IL-6, produite par les fibroblastes, les cellules endothéliales, les myocytes et les cellules endocrines, stimule la production des anticorps par les plasmocytes et la synthèse des protéines de phase aiguë par les hépatocytes. TNF- $\alpha$  et IL-6 sont aussi produits par les adipocytes (Fried et coll., 1998). Ces cytokines ont une action autocrine (dirigée vers les cellules sécrétrices), paracrine (vers les cellules voisines) et endocrine. Leurs actions autocrine et paracrine prédominent sur leur effet endocrine, ce dernier s'observant surtout en cas d'hypersécrétion de ces cytokines (comme c'est le cas dans l'obésité).



**Figure 2: Adipokines majeures sécrétées par le tissu adipeux. Sont représentées les adipokines-clef, particulièrement celles liées à l'inflammation**



TNF- $\alpha$  est fortement surexprimé dans divers modèles d'obésité et chez des patients obèses insulino-résistants (Hotamisligil et coll., 1995). Chez le rat obèse, la neutralisation du TNF- $\alpha$  résulte en une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la capture périphérique de glucose (Hotamisligil et coll., 1993). Cependant, cet effet n'a pas été mis en évidence chez l'homme. Chez les sujets obèses, les concentrations en TNF- $\alpha$  sont élevées et associées à des marqueurs d'obésité et d'insulino-résistance. Environ 30% de l'IL-6 sécrétée est issue du tissu adipeux. L'IL-6 plasmatique croît proportionnellement avec le développement de l'obésité (Mohamed-Ali et coll., 1997), et les études épidémiologiques en font un facteur de risque d'athérosclérose.

L'insulino-résistance induite par TNF- $\alpha$  pourrait être indirecte, par augmentation des taux d'AGL (*Acides Gras Libres*), mais aussi directe, par blocage des voies de transmission du signal insuline en inhibant l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (Hotamisligil et coll., 1995). TNF- $\alpha$  bloque également la capture de glucose par régulation négative de l'expression du gène du transporteur de glucose GLUT-4 (Hauner, 1995). Par ailleurs, TNF- $\alpha$  exercerait des effets délétères sur la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique en augmentant sa sensibilité aux effets glucolipotoxiques à travers la production de radicaux libres. L'implication du TNF- $\alpha$  dans l'insulino-résistance a été confirmée chez la souris obèse (*ob/ob*) invalidée pour le TNF- $\alpha$  ou pour ses récepteurs, les résultats montrant des concentrations réduites d'AGL et une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Il est cependant difficile de déterminer si l'augmentation des niveaux de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 sont la cause ou bien la conséquence de l'insulino-résistance induite par l'obésité. A la différence de la leptine, dont l'effet métabolique maximal se réalise dans l'organisme de poids normal, l'effet délétère du TNF- $\alpha$  survient lorsque l'animal commence à devenir obèse. Cependant, l'hyperproduction de TNF- $\alpha$  par l'adipocyte du sujet obèse inhibe la synthèse des triglycérides dans les adipocytes, limitant l'hypertrophie adipocytaire. Si la participation du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 au syndrome métabolique ne fait guère de doute, leur contribution au risque génétique de diabète de type 2 et d'insulino-résistance reste discutée.

Une autre étape importante dans l'identification du TA comme un organe endocrine consiste en la découverte de l'expression de la **leptine** en 1994 (Zhang et coll., 1994). La

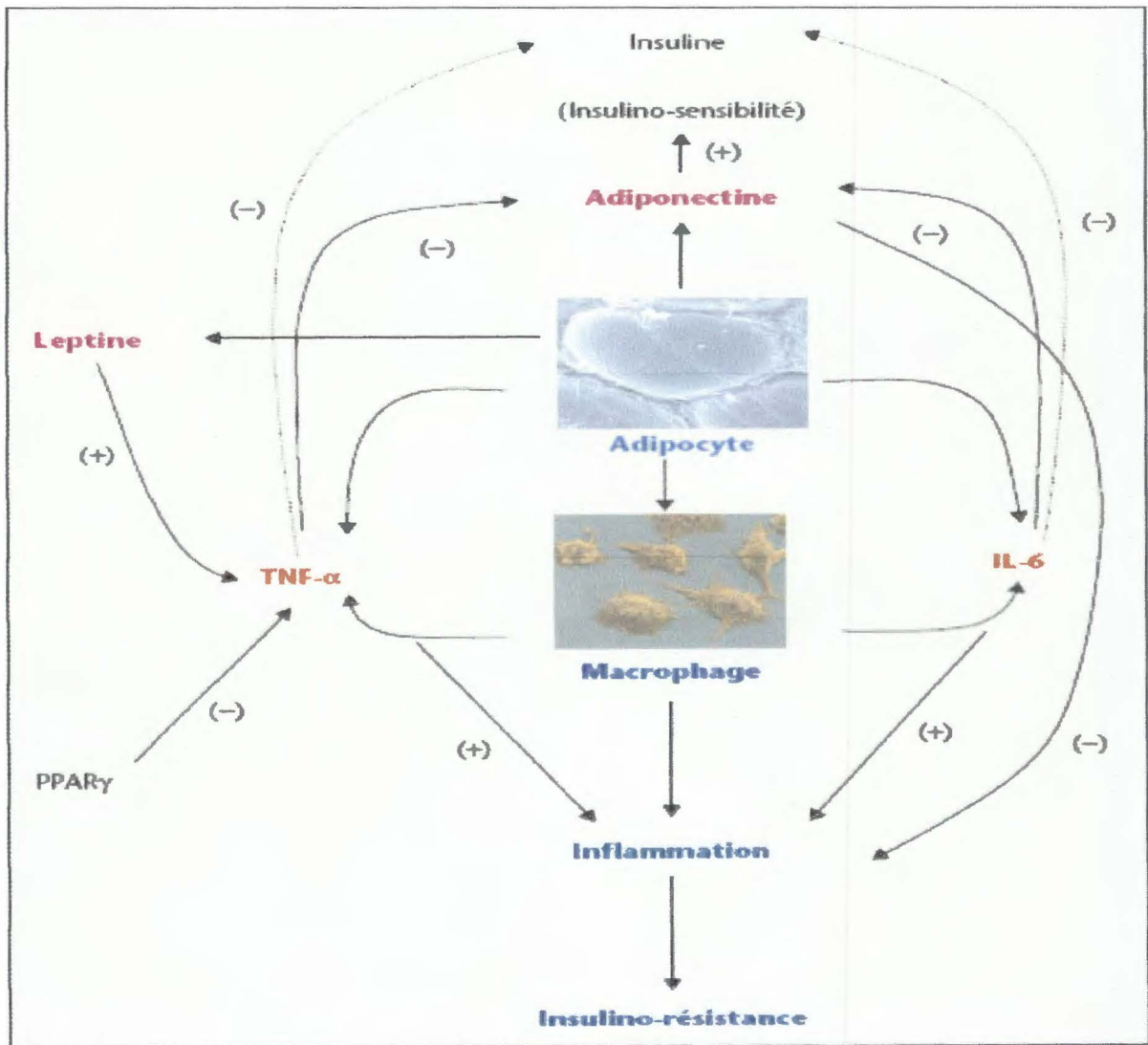
leptine, une autre cytokine produite principalement par le tissu adipeux, a pour rôle majeur d'assurer un contrôle à long terme de la masse graisseuse. Elle est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire avec une structure similaire aux IL-6 et IL-12. Son rôle essentiel est le contrôle de l'appétit et la régulation de la prise alimentaire (La Cava et coll., 2004). Sa sécrétion est proportionnelle à la masse de tissu adipeux et ses effets sont principalement centraux : la liaison de la leptine sur son récepteur hypothalamique réduit la prise alimentaire et modifie le tonus du système nerveux autonome, agissant ainsi sur la sécrétion de l'insuline, la production hépatique de glucose et le métabolisme glucolipidique musculaire (Harris, 2000 ; Rayner et coll., 2001). Comme il existe des récepteurs de la leptine fonctionnels au niveau des tissus périphériques insulinosensibles, une action directe de cette hormone a été suggérée, mais les résultats des études sont contradictoires. Il semble cependant que la leptine, tout comme l'adiponectine, soit capable de stimuler le MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinase et agir ainsi sur la concentration musculaire de malonyl-CoA et sur l'oxydation des acides gras. ***Le rôle clef de la leptine est la régulation de l'homéostasie énergétique.*** Elle fonctionne en donnant un signal négatif pour le stockage des lipides. La leptine est une forme de lipostat : en réponse à l'augmentation des réserves adipeuses, elle provoque l'arrêt de la prise alimentaire et augmente les dépenses énergétiques, exerçant ainsi un rétrocontrôle négatif sur la masse adipeuse (Ailhaud, 2006). Par ailleurs, la sécrétion de la leptine est plus importante dans le TA sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral et la concentration circulante élevée de cette hormone trouvée chez les femmes est probablement relative à une proportion, plus élevée, de TA sous-cutanée (Ahima et coll., 2000). La leptine joue encore un rôle dans l'immunité en stimulant la sécrétion des IL-12, IL-6 et TNF- $\alpha$  dans les macrophages et les monocytes (Gainsford et coll., 1996).

Parmi les autres protéines sécrétées essentiellement par les adipocytes, on peut citer aussi l'**adiponectine** qui est une protéine plasmatique sécrétée également par les cellules musculaires squelettiques et les cellules endothéliales (Delaigle et coll., 2004 ; Wolf et coll., 2006). Elle a été identifiée et caractérisée de manière indépendante et simultanée par plusieurs auteurs, chez l'homme comme chez la souris. Cela explique ses diverses appellations dans la littérature : adipoQ, par analogie structurale avec la fraction C1q du complément et des cytokines de type TNF, ACRP30 (*Adipocyte Complement-Related Protein 30*) ou GBP28 (*Gelatin Binding Protein 28*). Dès sa découverte par Scherer en 1995, le rôle de l'adiponectine dans l'homéostasie énergétique a été suspecté du fait de la

modulation de sa sécrétion par l'insuline. Son implication dans le catabolisme des lipides a été aussi suggérée. Il a fallu attendre les années 2000 pour que la relation étroite entre insulino-résistance et adiponectine soit métaboliquement confirmée et ses bases moléculaires en partie expliquées. Chez l'homme, l'adiponectinémie est corrélée négativement à l'indice de masse corporelle (IMC) (Weyer et coll., 2001). Les situations pathologiques associant une insulino-résistance au diabète de type 2 et à l'obésité, comme c'est le cas du diabète gestationnel, présentent des taux sériques d'adiponectine effondrés (Guerre-Millo et coll., 2004 ; Atégbo et coll., 2006). Cela suggère que l'adiponectine pourrait être non seulement un marqueur de sensibilité à l'insuline, mais aussi un lien métabolique entre l'activité du tissu adipeux et l'insulino-résistance.

Si la variation des taux sériques d'adiponectine est étroitement liée à la sensibilité à l'insuline chez l'homme, la relation causale entre ces deux événements reste à démontrer. Cependant, la diminution des taux d'adiponectine semble précéder l'apparition de l'insulino-résistance, et «prédit» mieux que la glycémie et l'insulinémie la progression vers le diabète de type 2 (Stefan et coll., 2002). Une perte de poids chez des sujets obèses accompagnée d'une amélioration de l'insulinosensibilité entraîne une augmentation des taux plasmatiques d'adiponectine. De plus, les effets insulinosensibilisants des nouvelles molécules antidiabétiques comme les agonistes du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (thiazolidinediones) s'accompagnent d'une élévation de l'adiponectinémie. L'effet de l'adiponectine dans la régulation de l'homéostasie énergétique a été le plus étudié ; elle induirait un accroissement de l'oxydation des AGL (Fruebis et coll., 2001) et la dissipation d'énergie par le muscle, conduisant à une diminution du contenu musculaire, mais aussi hépatique, en triglycérides (Yamauchi et coll., 2001). L'adiponectine permettrait également d'augmenter la capture musculaire du glucose et de diminuer sa production par le foie (principale anomalie responsable de l'hyperglycémie postprandiale des diabétiques), sans variation directe des taux plasmatiques. Tous ces effets entraîneraient une amélioration des paramètres majeurs de l'homéostasie glucidique (capture de glucose, production hépatique de glucose) non pas à travers un effet sur la sécrétion d'insuline, mais par la potentialisation de ses effets tissulaires.

Il reste beaucoup d'inconnues dans le mode d'action de l'adiponectine. Si cette hormone ne semble pas avoir d'effet direct sur la cellule  $\beta$  (l'incubation d'îlots de Langerhans avec de l'adiponectine ne modifie en particulier pas la sécrétion d'insuline en réponse au glucose), d'autres effets sur la balance énergétique, en particulier centraux, ne sont pas à exclure. De plus, l'expression du gène *APM1* (*AdiPose Most abundant gene transcript 1*) codant l'adiponectine et sa sécrétion semble hautement régulée par l'état métabolique : d'autres cytokines, le  $TNF-\alpha$  en particulier, sont de puissants inhibiteurs de l'expression d'*APM1*, ce qui pourrait expliquer l'hypo adiponectinémie associée à l'obésité. (Figure 3).



**Figure 3 : Sécrétion des cytokines et des adipokines et leurs implications dans l'insulinorésistance**

### **2. 1. 1. Les adipokines**

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

Le nombre total d'adipokines répertoriées et documentées dépasse la cinquantaine. Bon nombre de ces adipokines sont impliquées dans la réponse immunitaire et dans l'inflammation ainsi que dans les interactions entre les adipocytes et le système immunitaire (Pond, 2005). La diversité des adipokines est considérable, en termes de structure de protéine et de fonction. Les adipokines englobent des cytokines pro-inflammatoires telles que (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10), des chimiokines telles que la Protéine Chémottractrice des Monocytes de type 1 (MCP-1), les protéines du système de complément alternatif (ex, adipsine), les protéines impliquées dans l'homéostasie vasculaire (ex, Inhibiteur de l'Activateur de plasminogène-1 (PAI-1), dans la pression artérielle (angiotensinogène), le métabolisme des lipides (ex, protéine de transfert des esters de cholestérol, protéine de liaison du rétinol), l'homéostasie du glucose (ex, adiponectine), la prise alimentaire (leptine) et l'angiogenèse [Facteur Endothélial Vasculaire de Croissance (VEGF) (Trayhum et coll., 2006)].

### **2. 1. 2. Les cytokines**

Les cytokines ont été décrites par McDermott (2001) comme des protéines pharmacologiquement actives avec une masse moléculaire relativement faible (8 à 30 kDa) agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. Elles sont généralement sécrétées par les cellules du système immunitaire dont le but est de modifier ses propres fonctions (effet autocrine) ou celles des autres cellules adjacentes (effet

paracrine). Ces cytokines exercent des activités biologiques multiples surtout dans l'inflammation et la réponse immunitaire (Coppack, 2001). Plus de 200 ligands de cytokines ont été identifiés et regroupés sous plusieurs familles comme :

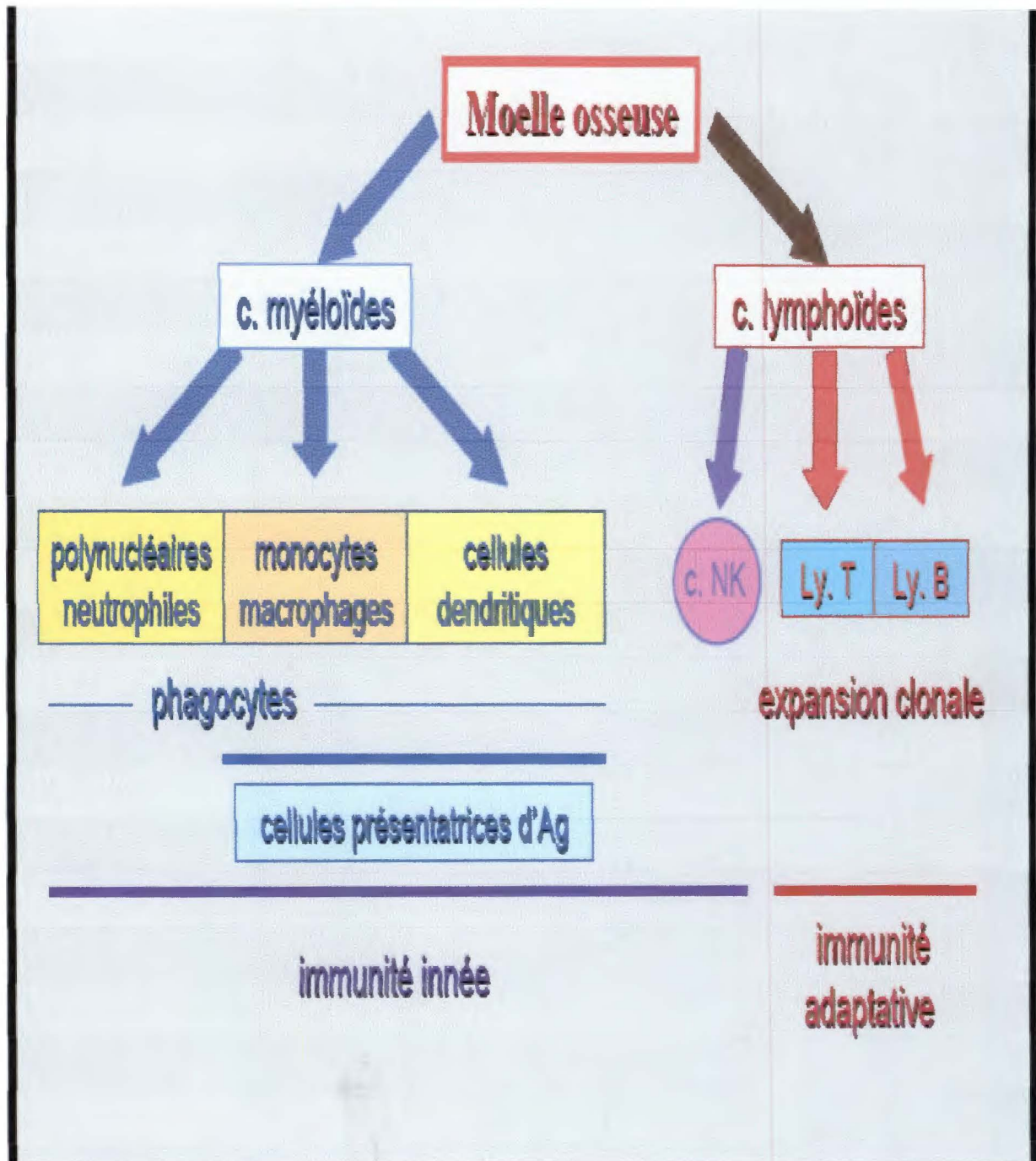
- **Les interférons (IFN)**, découverts en 1957 et connus pour leur activité anti-virale. Il en existe trois isoformes  $-\alpha$ ,  $-\beta$  et  $-\gamma$ .
- **Les interleukines (IL)**. Il s'agit de cytokines regroupées sous cette terminologie sans parenté biochimique ni de fonction, mais classées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

## 2. 2. Le système immunitaire

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

Le système immunitaire est un réseau complexe de cellules et molécules interactives qui sont impliquées dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Le rôle du système immunitaire est de reconnaître, contrôler, et éliminer efficacement ces agents pathogènes. Le système immunitaire de l'homme et des vertébrés supérieurs repose sur deux piliers, l'immunité spécifique constituée des lymphocytes T et B, de cinétique lente mais

dotée de mémoire et l'immunité innée où participent de nombreuses cellules hématopoïétiques (polynucléaires, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques, lymphocytes NK) (**Figure 4**), de déclenchement rapide sans mémorisation des expériences passées.



**Figure 4 : Origine Hématopoïétique des cellules immunitaires**



### **2. 2. 1. Immunité naturelle**

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

### **2. 2. 2. Immunité adaptative**

Ce type d'immunité comprend les anticorps et les cellules qui peuvent attaquer et détruire des agents envahisseurs spécifiques. Pour que ce type d'immuno-réponse atteigne son efficacité maximale, une exposition antérieure à l'agent étranger ou à l'organisme envahisseur est requise. L'immuno-réponse est relativement lente mais l'immunité conférée est durable. La capacité de réponse aux stimuli immunologiques se situe principalement dans les cellules lymphoïdes (**Figure 4**). Il y a deux populations principales de lymphocytes qui sont les lymphocytes T (ou cellules T) et les lymphocytes B (ou cellules B). Les cellules B s'attaquent aux microorganismes extracellulaires et à leurs produits en sécrétant des anticorps qui reconnaissent spécifiquement l'antigène. Les lymphocytes T ont une gamme d'activités plus large. Certains sont impliqués dans le contrôle du développement des lymphocytes B et de la production d'anticorps. D'autres cellules T interagissent avec les cellules phagocytaires pour les aider à détruire les microorganismes intracellulaires.

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



## **2. 3. Les cellules immunocompétentes**

### **2. 3. 1. Les phagocytes mononucléés**

Ils correspondent aux monocytes et à toutes les autres cellules qui en découlent. Les monocytes ne demeurent que 2 ou 3 jours dans la circulation sanguine d'où ils peuvent migrer vers les organes et tissus de l'organisme et devenir des macrophages différenciés, grandes cellules au polymorphisme considérable qui possèdent un grand nombre de récepteurs membranaires. Ces macrophages sont distribués dans tout l'organisme (foie, rate, ganglions lymphatiques, cerveau, poumons, cavités séreuses pleurale et péritonéale, tractus gastro-intestinal, etc.). Les macrophages jouent un rôle tant dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative et ont pour fonctions essentielles la participation à l'inflammation (liaison aux cellules tumorales et transfert de l'information antigénique), une forte activité antitumorale et antibactérienne et la présentation de l'antigène. En l'absence d'activation, les macrophages peuvent proliférer, répondre aux facteurs chimiotactiques et être aptes à la phagocytose.

### **2. 3. 2. Les phagocytes polynucléaires**

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

### **2. 3. 3. Les lymphocytes**

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

beaucoup plus réduit. Les lymphocytes des organes et des tissus lymphoïdes peuvent être activés de façon différente par suite d'une stimulation antigénique.

### **2. 3. 3. 1. Les lymphocytes B**

Ils se composent de lymphocytes qui, à l'inverse des cellules T, ne requièrent pas le thymus pour la maturation. Ils représentent 10 à 20% des lymphocytes du sang périphérique. Ils se développent dans les tissus lymphoïdes périphériques (ganglions, rate) et dans la moelle osseuse. Le récepteur des cellules B (BCR, de l'anglais *B Cell Receptor*) est constitué par une immunoglobuline ou anticorps (Ig) membranaire et permet la reconnaissance des antigènes circulants. Chaque lymphocyte B exprime une seule Ig de surface, le plus souvent IgM, parfois IgG, IgA ou IgM+IgD. Ils sont la source de l'immunité dite "humorale" grâce à la production des anticorps. Ces derniers attaquent les matières étrangères et les agglutinent pour les faire détruire par les autres composants de l'immuno-système. La reconnaissance d'un antigène par les lymphocytes B induit leur prolifération et leur différenciation en centroblastes, centrocytes, puis en plasmocytes qui vont produire les anticorps spécifiques de l'antigène. L'immunité à médiation d'anticorps est importante dans les troubles induits par des toxines, dans certaines infections microbiennes, ou pour écourter quelques infections virales.

### **2. 3. 3. 2. Les lymphocytes T**

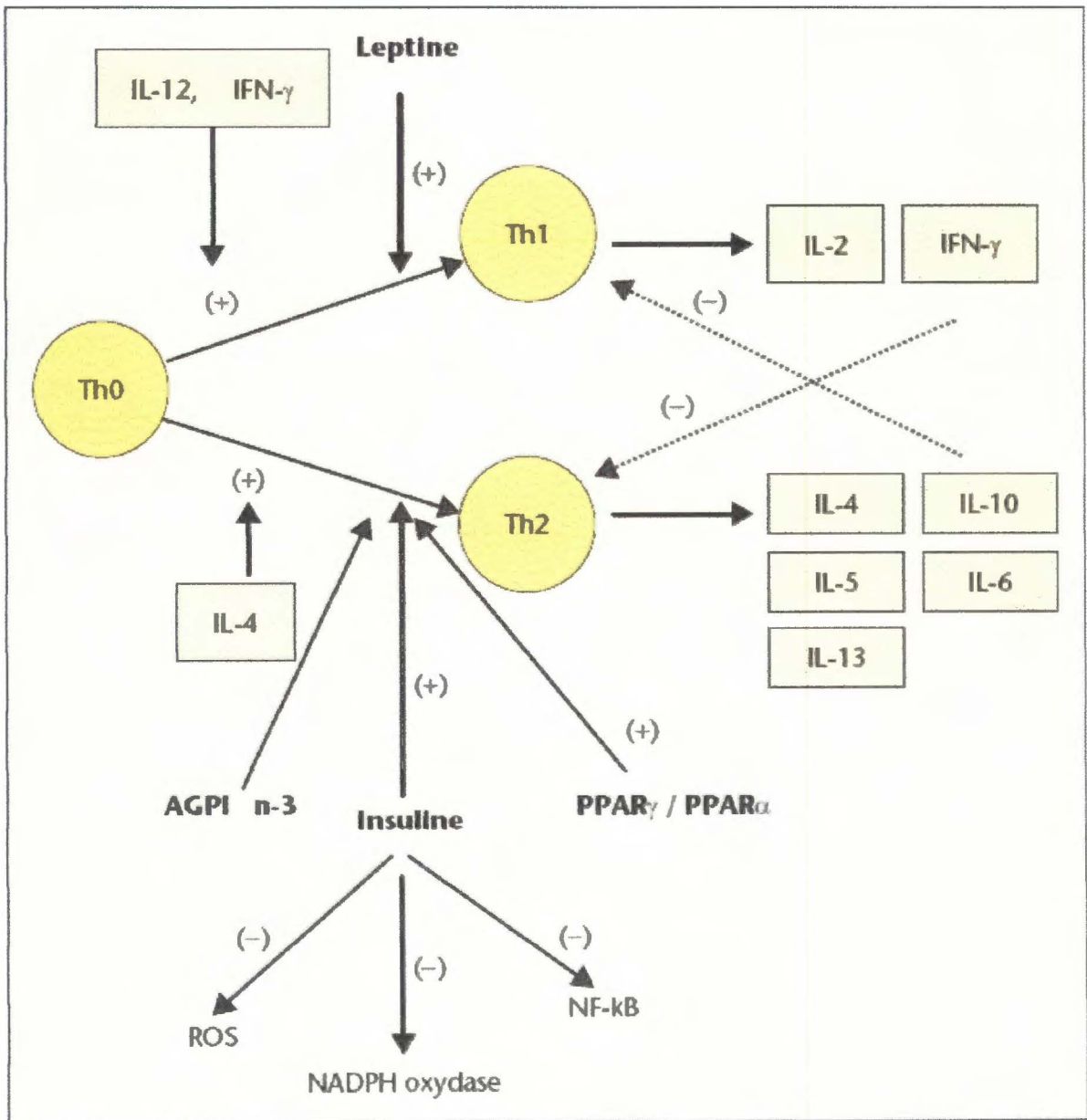
Ce sont les lymphocytes produits dans le thymus (petite glande située dans le thorax) et les organes lymphoïdes périphériques. Le thymus est nécessaire à leur maturation. Au cours de cette maturation, ils expriment différents marqueurs de surface : CD2 et CD3 exprimés sur la totalité des lymphocytes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

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

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

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

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



**Figure 5 : Différenciation des lymphocytes Th0 en cellules Th1 et Th2 et, leurs modulations.**

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

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

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

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

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

La leptine, impliquée dans la régulation de l'obésité, en modifiant le métabolisme lipidique, diminue l'appétit en interférant avec le neuropeptide Y et le récepteur de la

mélanocortine dans l'hypothalamus (Halaas et coll., 1995 ; Li et coll., 2005). La leptine est également produite par le placenta ; sa concentration est élevée chez les sujets obèses. Elle exerce un effet agrégeant sur les plaquettes sanguines et, par conséquent, pourrait réguler le système immunitaire. Les récepteurs de la leptine ont été récemment identifiés sur les lymphocytes murins (Papathanassoglou et coll., 2006) ; ils inhibent l'apoptose cellulaire T et favorisent leur survie en modifiant la signalisation via le facteur de transcription STAT-3 qui régule les gènes de réparation de l'ADN et permet la résistance aux traitements génotoxiques (Vigneron et coll., 2006). En ce qui concerne la différenciation cellulaire T, la leptine induit la polarisation des cellules Th0 vers le phénotype Th1 et augmente la sécrétion de cytokines proinflammatoires.

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

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

Les lymphocytes T n'expriment les récepteurs de l'insuline (IR) que s'ils sont activés. Dès lors, l'insuline oriente la différenciation des lymphocytes naïfs vers le phénotype Th2 (Viardot et coll., 2006), indiquant que les ***effets anti-inflammatoires de cette hormone passeraient également par une action directe sur ces cellules immunitaires.*** Ces observations, à nouveau, démontrent une interaction entre la différenciation des cellules T et cette hormone hypoglycémiante.

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

Il a été démontré que le tissu adipeux, mis à part la sécrétion des adipokines (adiponectine et leptine), sécrète également des cytokines pro-inflammatoires, principalement TNF- $\alpha$  et IL-6. Creely et coll., (2007) ont étudié l'interaction entre les adipokines et les récepteurs TLR (en anglais, *toll-like receptors*), impliqués dans la détection des composés microbiens, sur des adipocytes humains isolés. Ils en ont conclu que le lipopolysaccharide, composant essentiel de la paroi bactérienne, augmente non seulement la sécrétion de l'IL-6, du TNF- $\alpha$  mais également l'expression de TLR-2 sur les adipocytes via la cascade de l'inflammation.

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

Il a été signalé par Weisberg et coll., (2003) que le tissu adipeux des sujets obèses contient non seulement des adipocytes mais aussi des cellules endothéliales et des macrophages qui l'infiltrent. Ces mêmes auteurs ont démontré que l'IMC est directement lié au degré d'infiltration des macrophages. De plus, les adipocytes libèrent des facteurs qui favorisent l'infiltration et la différenciation des macrophages comme le MCP-1 (en anglais, *monocyte chemotactic protein-1*), un agent chimiotactique monocytaire, et le CSF-1 (en anglais, *colony stimulating factor*), un facteur responsable de la différenciation monocyte-macrophage. Récemment Lacasa et coll., (2006), effectuant des expériences sur des adipocytes humains en présence de surnageant de macrophages, ont suggéré que les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux pourraient exercer une action paracrine et, par conséquent, moduler les fonctions adipocytaires.

Il existe une corrélation positive entre TNF- $\alpha$  et le taux de C-peptide (Winkler et coll., 2002). Le tissu adipeux de sujets obèses contient beaucoup plus d'iNOS (en anglais, *inducible NO synthase*), de TGF- $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor-beta-1*), de protéine C-réactive et

d'ICAM (*Intercellular Adhesion Molecule*) que les sujets minces (Hotamisligil et coll., 1994 ; Sartipy et coll., 2003). Il est intéressant de noter que le taux des ARNm de TNF- $\alpha$  diminue après une baisse de poids chez les sujets obèses (Hotamisligil et coll., 1995 ; Kern et coll., 1995). Clement et coll., (2004) ont constaté, chez les patients obèses, qu'un régime peu calorique diminue non seulement la masse grasseuse mais également l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires dans les adipocytes. Ce régime augmente par contre l'expression des gènes codant pour les agents anti-inflammatoires. D'autres études démontrent aussi qu'une baisse de l'IMC est associée à la diminution de facteurs inflammatoires chez les sujets obèses (Kopp et coll., 2003 ; Esposito et coll., 2003). ***Ces observations suggèrent qu'il existe une corrélation directe entre l'obésité et l'état inflammatoire*** (Dandona et coll., 1998 ; 2004 ; 2005).

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

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

L'IL-6 semble également être impliquée dans la pathogenèse du diabète de type 2, l'adiposité anormale et les anomalies lipidiques (Mohamed-Ali et coll., 1997). ***Il est intéressant de noter qu'entre 10 et 30% du taux d'IL-6 circulant sont dérivés des tissus adipeux, ce qui suggère son rôle probable dans les pathologies métaboliques.*** L'IL-6 régule



l'équilibre énergétique. Chez l'homme et chez l'animal, il existe une corrélation positive entre son taux et celui de la leptine. L'IL-6 peut aussi jouer un rôle dans l'adiposité au niveau central. En effet, l'hypothalamus ventro-médiane, région qui contrôle l'équilibre énergétique, exprime les récepteurs de l'IL-6 (Schobitz et coll., 1993). Les souris, n'exprimant pas le gène de cette cytokine, développent prématurément l'obésité car ils mangent exagérément (Wallenius et coll., 2002) alors que son administration intra-cérébro-ventriculaire corrige l'obésité (Wallenius et coll., 2002) et diminue la masse grasseuse chez les primates (Ettinger et coll., 1995). Malgré ces observations, le rôle exact de l'IL-6 dans la régulation de l'obésité n'est pas bien défini. Toutefois, *il existe une corrélation positive entre le taux de l'IL-6 circulant, l'adiposité* (Mohamed-Ali et coll., 1997) *et l'insulinorésistance* (Bastard et coll., 2000).

Il a été suggéré que l'augmentation de TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 chez les sujets diabétiques est une conséquence du stress oxydatif induit par l'hyperglycémie (Sternberg, 1992). Mohanty et coll., (2000) ont démontré que l'ingestion de glucose chez les sujets normaux diminue la concentration de l' $\alpha$ -tocopherol (vitamine E) et augmente l'expression du facteur cytosolique p47phox dans les cellules mononucléaires périphériques. De plus, chez ces sujets, la production des ROS (en anglais, *reactive oxygen species*) augmente de l'ordre de 200% par rapport à la concentration basale. *Tout comme TNF- $\alpha$ , l'IL-6 diminue également la signalisation de l'insuline* (Senn et coll., 2002) *et, par conséquent, contribue à l'insulinorésistance.*

#### **2. 4. 5. Interactions entre adiponectine, leptine, IL-6 et TNF- $\alpha$**

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

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

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

sécrétion de leptine et de TNF- $\alpha$  alors que la concentration de l'adiponectine diminue (Morris et coll., 2006). D'autre part, l'administration des anticorps anti-TNF- $\alpha$  diminue l'inflammation et restaure le taux de l'adiponectine. *Ces résultats suggèrent que la leptine est pro-inflammatoire et que l'adiponectine exerce un effet anti-inflammatoire.*

---

## Chapitre 3

---

### *Diabète gestationnel, macrosomie et statut antioxydant*

---

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène, élément indispensable à la vie, produit de manière continue au niveau de la mitochondrie de faibles quantités de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Le rôle physiologique de cette production basale de dérivés réactifs de l'oxygène, dont font partie les radicaux libres, n'est pas totalement connu, mais certaines de ces molécules pourraient avoir une fonction dans les processus de signalisation cellulaire. Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. En raison de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les DRO ont été impliqués dans un très grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (Gutteridge, 1992). Pour se protéger contre cet effet toxique de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de réguler la production de ces DRO. Ces systèmes sont composés d'antioxydants (e.g : le groupe des vitamines A, C et E), d'oligo-éléments et de protéines qui empêcheront le fer de déclencher une production de DRO. Des enzymes protéolytiques dont le rôle consiste à dégrader les substrats oxydés, complètent cette panoplie. Déterminer le statut anti-oxydant d'un individu devient actuellement un sujet de priorité en terme de prévention de maladies car de très nombreuses études indiquent *qu'il existe une association étroite entre l'altération des systèmes de défense antioxydants et le développement de plus de 200 pathophysiologies différentes allant de l'athérosclérose au cancer en passant par le SIDA, les maladies inflammatoires, le diabète et le vieillissement* (Gutteridge, 1992).

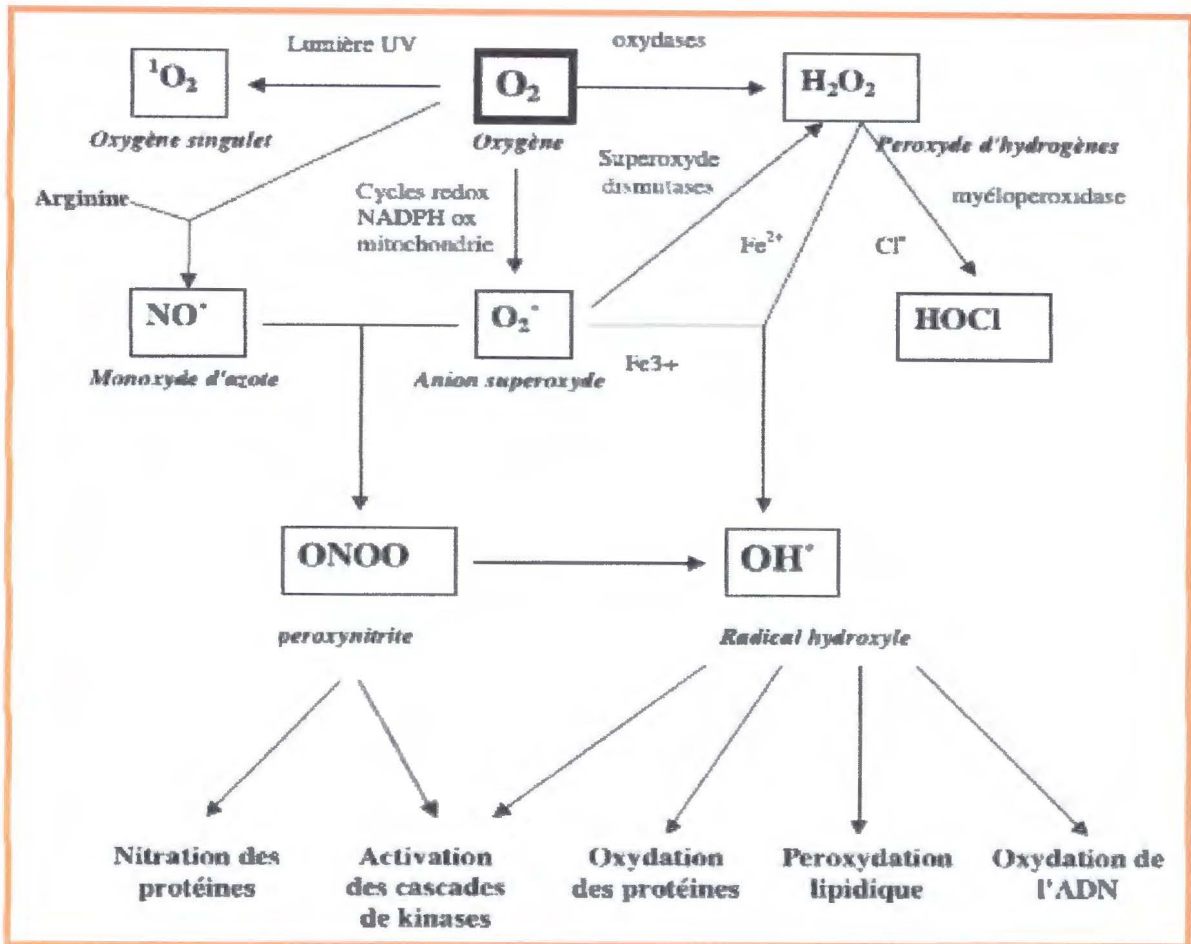
#### **3.1. Origine du stress oxydant**

La découverte d'espèces chimiques radicalaires présentes normalement dans l'organisme a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Ces radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable; mais la production peut devenir excessive ou résulter de phénomènes toxiques exogènes et l'organisme va devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité comme les médiateurs tissulaires ou les résidus des

réactions énergétiques ou de défense, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « *stress oxydant* ».

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

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde  $O_2^-$  et le radical hydroxyle  $OH^\bullet$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO^\bullet$  (Yoshikawa et coll., 2000). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$ , le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé **espèces réactives de l'oxygène (Figure 6)**.



**Figure 6 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.**

Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la **respiration mitochondriale** dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaires. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Si usuellement cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2 %), elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie), ou lorsqu'interviennent des désordres inflammatoires ou nutritionnels. L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les **cellules phagocytaires activées** qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH (*Nicotinamide*

*adenine dinucleotide phosphate*) oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire.

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

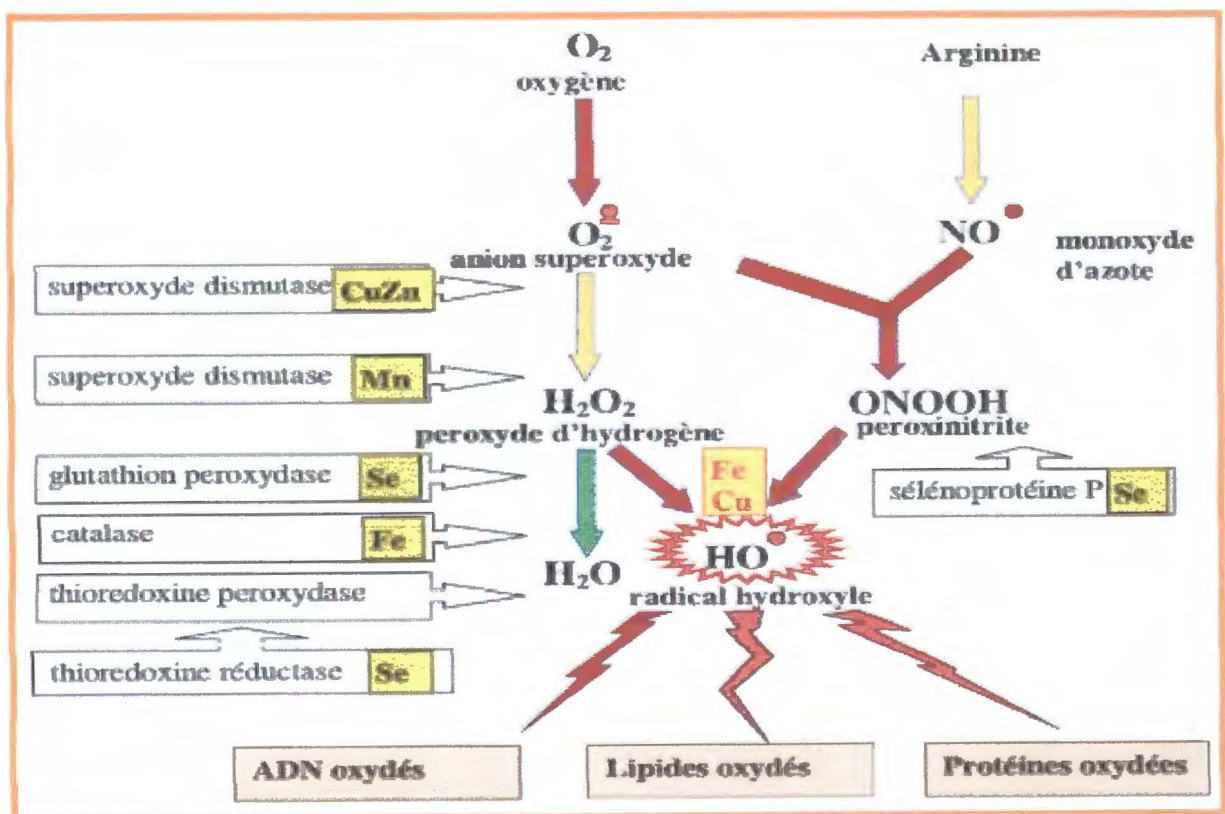
Notre organisme utilise de nombreuses stratégies antioxydantes et consomme beaucoup d'énergie pour contrôler le niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (Kinsky, 1989). La vitamine piégeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases (Packer, 1991). Ce type d'antioxydant est appelé piégeur ou éboueur (« *scavenger* » pour les Anglo-saxons). De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement: polyphénols, alcaloïdes, phytates (Bors et coll., 1990). Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO•. La plupart des composés biologiques réagissant avec (donc piégeant) le radical hydroxyle, il conviendra de réserver le terme d'antioxydant à des composés dont la teneur dans les tissus diminue lors d'un stress oxydant *in vivo* et qui ne donnent pas de dérivés toxiques.

L'autre stratégie utilisée est de nature enzymatique, visant à détruire les superoxydes et peroxydes. Ainsi, les superoxydes dismutases (SOD) sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au coeur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, des superoxydes dismutases à cuivre-zinc protégeant le cytosol (cCu-ZnSOD), la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou le plasma sanguin (pCu-ZnSOD). Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer, présentes dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, et les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium (Ganther, 1999). Des glutathions peroxydases à sélénium



existent dans le cytosol (cGPx), dans le plasma (pGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et une isoenzyme est spécifique des cellules digestives (GIGPx). Ces enzymes sont sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement  $H_2O_2$ , mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium.

Le rôle des SOD et des peroxydases est complémentaire car une bonne protection ne peut être obtenue par les superoxydes dismutases seules (**Figure 7**). Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, la glutathion transférase, les thioredoxines réductases ou les thioredoxines peroxydases. La plupart des enzymes décrites ci-dessus, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH (*Nicotinamide Adénine Dimucléotide Phosphate*), qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante. La production d'énergie ne semble pas ici en elle même capitale (la diminution de l'ATP facilitant même la formation du NADPH).



**Figure 7 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.**



### 3. 3. Diabète gestationnel, macrosomie et stress oxydatif

De nombreuses études montrent une augmentation des marqueurs du stress oxydatif au cours du diabète de type 2 (Nourooz-Zadeh, 1995; Dandona, 1996; Ciriello, 1996; Thornalley, 1996; Leinonen, 1997), ainsi qu'une diminution des mécanismes de défense vis-à-vis des radicaux libres (Yoshida, 1995; Santini, 1997; Opara, 1999; Rehman, 1999), associée à une diminution du taux d'acide urique et d'acide ascorbique circulant (Sundaram, 1996; Will, 1996; Maxwell, 1997). On observe également une diminution de la superoxyde dismutase et de la catalase chez des patients ne présentant qu'une intolérance au glucose, chez qui une diminution de l'acide ascorbique et du glutathion réduit est également déjà présente (Vijayalingam, 1996). Paolisso et coll., (1994) ont observé qu'il existait une corrélation positive entre les radicaux libres plasmatiques et l'insulinémie à jeun, et une corrélation négative avec l'utilisation du glucose, en particulier son utilisation non oxydative, dont la diminution est un élément essentiel de la physiopathologie du diabète de type 2. Il est possible que cette anomalie du statut oxydatif au cours du diabète de type 2 soit secondaire à l'hyperglycémie (bien que comme on l'a vu, elle est déjà observée en cas de simple intolérance au glucose) : on trouve une corrélation négative entre le taux d'hémoglobine glyquée et l'activité de "scavenger" du plasma vis-à-vis des radicaux libres, le taux d'acide urique (Maxwell, 1997), et un traitement intensif du diabète améliore les taux circulants de malonyldialdéhyde (MDA) (Wierusz-Wysocka, 1995). A court terme, une simple hyperglycémie provoquée par voie orale diminue les défenses antioxydantes de l'organisme chez des sujets sains ou diabétiques non insulinodépendants (Ceriello, 1998).

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

réduit augmente l'utilisation du glucose au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (De Mattia, 1998).

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

Il est possible que les radicaux libres interviennent chez l'homme dans l'apparition des troubles de l'insulinosécrétion et de la sensibilité à l'insuline qui caractérisent le diabète de type 2. D'une part, les cellules  $\beta$  sont très sensibles au stress oxydatif et d'autre part, de nombreuses données expérimentales indiquent que ce dernier pourrait représenter un mécanisme par lequel l'hyperglycémie chronique aggrave la fonction insulinosécrétoire dans le diabète de type 2. Une publication récente, montrant que la metformine protège les îlots contre les effets délétères des lipides sur la sécrétion d'insuline par des îlots isolés (Patane, 2000), suggère que le stress oxydatif pourrait également jouer un rôle dans les mécanismes de la lipotoxicité au niveau de la cellule  $\beta$ .

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

---

## *Chapitre 4*

# *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) et différenciation cellulaire*

---

Depuis 1990 où ils ont pour la première fois été identifiés, les PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors*) suscitent un intérêt considérable. Nos connaissances sur leurs rôles physiologiques ne cessent d'évoluer. Impliqués dans la régulation du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, l'homéostasie du glucose, la prolifération cellulaire et la différenciation, les PPARs sont une cible pharmacologique pour le traitement de désordres métaboliques tels que les hyperlipémies ou le diabète. Ils ont plus récemment été impliqués dans la réponse inflammatoire (Chinetti et coll., 2000). Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires qui se définissent comme des facteurs de transcription qui règlent l'expression d'un certain nombre de gènes en réponse à l'activation par un ligand. Trois types de PPAR, nommés  $\alpha$ ,  $\delta$  (également appelé  $\beta$  ou NUC-1) et  $\gamma$  ont été décrits. Ils sont codés par des gènes distincts et se caractérisent par des distributions tissulaires différentes (Braissant et coll., 1996). Alors que PPAR $\alpha$ , sous l'action des fibrates, module la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, PPAR $\gamma$  est plutôt impliqué dans la différenciation cellulaire, l'adipogenèse et l'insulinorésistance, et PPAR $\beta$  dans le métabolisme lipidique et le cancer.

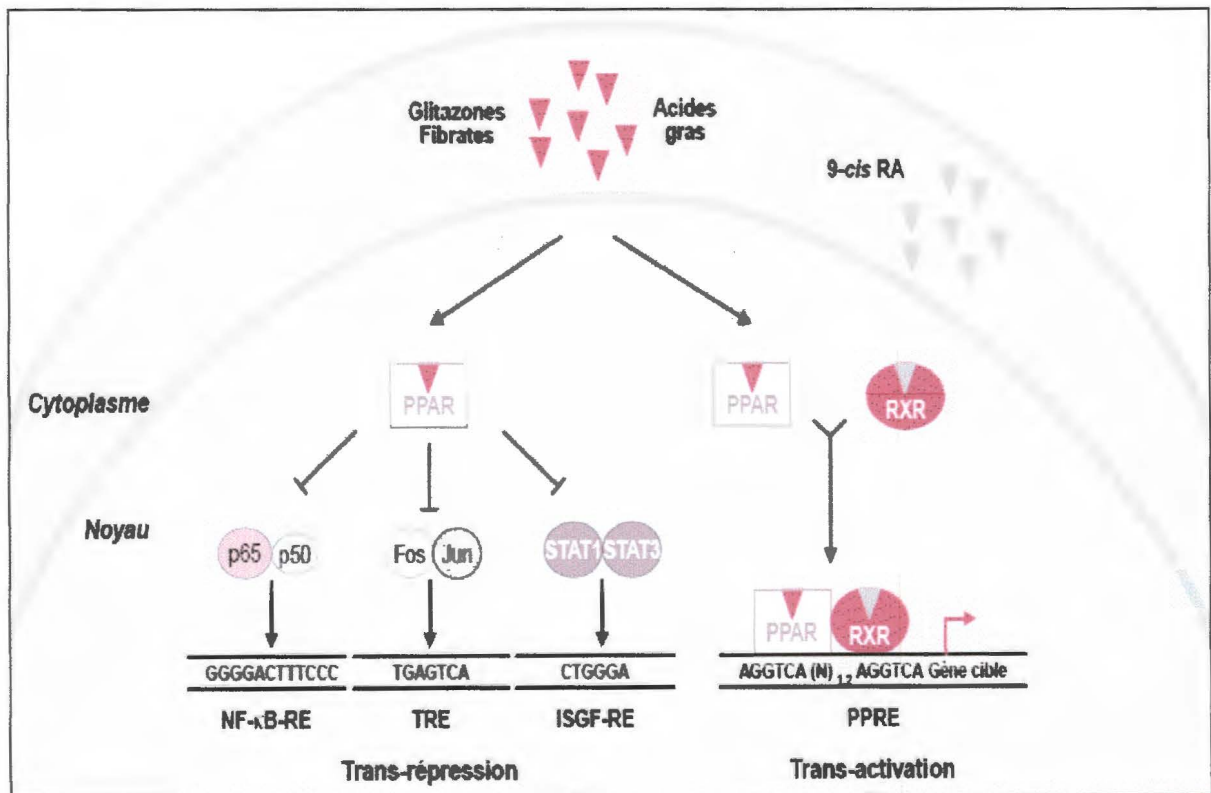
### **4. 1. Mécanismes moléculaires d'action des PPARs**

#### **4. 1. 1. Régulation de la transcription**

Les PPARs, quand ils sont inactifs, sont probablement sous la forme de complexes avec des protéines co-répresseurs et peuvent, dans certains types cellulaires, avoir une localisation plutôt cytoplasmique que nucléaire (Chinetti et coll., 1998). Après activation par leur ligand respectif, les PPARs se dissocient de leurs co-répresseurs et recrutent alors des protéines accessoires jouant le rôle de co-activateurs. La capacité des PPARs de recruter des co-facteurs et d'activer la transcription peut être modifiée par la phosphorylation de leur région amino-terminale. Les PPARs, après avoir formé des hétérodimères avec un autre récepteur nucléaire, le récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR : *Retinoid X Receptor*), reconnaissent des séquences spécifiques, les PPRE (*peroxisome proliferator response*

*elements*) situées dans les régions promotrices des gènes cibles dont l'expression est alors stimulée (Chinetti et coll., 2000). Les PPRE sont constitués de deux répétitions directes de la séquence hexamérique AGGTCA, séparées par un ou deux nucléotides. Ce processus de liaison des récepteurs aux PPRE correspond à la «trans-activation» (Figure 8).

Les PPARs peuvent aussi réprimer la transcription de certains gènes en interférant négativement avec les voies de signalisation de NF- $\kappa$ B, STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) et AP-1 (*Activating Protein 1*). C'est ce que l'on appelle alors la «trans-répression». Les mécanismes impliqués regroupent entre autres des interactions protéine/protéine et la formation de complexes inactifs, la liaison aux cofacteurs de ces voies de signalisation qui deviennent alors inefficaces, ou l'induction d'I $\kappa$ B $\alpha$ , inhibiteur majeur de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. On pense actuellement que cette trans-répression pourrait être le mécanisme de base des propriétés anti-inflammatoires des PPARs (Delerive et coll., 2001).



**Figure 8 : Trans-répression et trans-activation assurées par les PPARs activés par leurs ligands.** *Trans-répression* : les PPAR répriment la transcription des gènes en interférant négativement avec les voies NF- $\kappa$ B, AP-1 (Fos/Jun) et STAT1. *Trans-activation* : après hétérodimérisation avec le récepteur de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR), les PPAR reconnaissent des éléments de réponses (PPRE) situés dans les régions promotrices des gènes cibles dont l'expression est stimulée. 9-cis RA : acide 9-cis-rétinoïque. TRE : TPA response element ; ISGF-RE : interferon stimulated gene factor response element.

#### 4. 1. 2. Distribution tissulaire des PPARs

La distribution tissulaire et le niveau d'expression diffèrent selon l'isoforme considérée (Braissant et coll., 1996). PPAR $\alpha$  est exprimé principalement dans les tissus où le catabolisme des acides gras est important, tels que le foie, les reins, le coeur et les muscles. PPAR $\gamma$  est exprimé de façon préférentielle dans le tissu adipeux et l'intestin, mais on le détecte aussi dans les glandes mammaires et dans de nombreux tissus. Les deux isoformes  $\alpha$  et  $\gamma$  sont également exprimées dans les cellules de la paroi vasculaire: cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et monocytes/macrophages (Chinetti et coll., 1998). Alors que PPAR $\alpha$  est exprimé aussi bien dans les monocytes que les macrophages, l'expression de PPAR $\gamma$  est surtout mise en évidence dans les macrophages (Chinetti et coll., 1998). De plus, PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  sont tous deux présents dans la plaque d'athérosclérose, au niveau de la région sous-endothéliale et dans le noyau lipidique des lésions athérosclérotiques où ils sont co-localisés avec des marqueurs spécifiques des macrophages, des cellules musculaires lisses et des cellules spumeuses (Ricote et coll., 1998 ; Chinetti et coll., 2000). Enfin, l'expression tissulaire de PPAR $\beta$  est ubiquitaire.

#### 4. 1. 3. Ligands naturels et synthétiques des PPARs

Un large spectre de composés a été identifié comme ligands des PPARs (Kersten et coll., 2000). Parmi les ligands naturels, tous les acides gras peuvent activer les PPARs, mais l'on observe toutefois certaines différences selon le récepteur. Ainsi, PPAR $\alpha$  présente une spécificité assez faible pour leur degré de saturation, alors que PPAR $\gamma$  a une meilleure affinité pour les acides gras poly-insaturés. D'autres agonistes naturels de PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  sont dérivés de l'acide arachidonique par les voies de la cycloxygénase et de la lipoxygénase. On peut noter en particulier le leukotriène B4 (LTB4) et la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J<sub>2</sub> (PGJ<sub>2</sub>). Enfin, les acides gras oxydés dérivés des phospholipides des LDL oxydées (9- et 13-HODE) sont aussi des ligands naturels des PPARs.

Quant aux principaux ligands synthétiques des PPARs, leurs noms sont bien connus en thérapeutique. Il s'agit, pour PPAR $\alpha$ , des fibrates, médicaments utilisés dans le traitement de l'hypertriglycémie et de l'hyperlipidémie; et, pour PPAR $\gamma$  des glitazones qui sont utilisés dans le traitement du diabète de type 2.

Enfin, d'autres principes actifs comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens pourraient aussi être des agonistes des PPARs.

## 4. 2. Rôles physiologiques des PPARs

Le rôle de l'hypercholestérolémie, et des dyslipidémies en général, est maintenant reconnu comme majeur dans le développement des maladies métaboliques. L'étude des effets des agonistes des PPARs a permis de montrer qu'ils procurent un bénéfice global sur le métabolisme général des lipoprotéines en contrôlant leurs concentrations plasmatiques et leur composition.

### 4. 2. 1. PPAR $\alpha$

Les activateurs de PPAR $\alpha$ , les fibrates, diminuent les concentrations circulantes de triglycérides et augmentent celles du cholestérol-HDL (Staels et coll., 1998). La réduction du taux de triglycérides est due à une diminution de la synthèse hépatique des lipoprotéines de très basse densité riches en triglycérides (VLDL), et une augmentation de la lipolyse intravasculaire de ces lipoprotéines. Les fibrates stimulent en effet l'entrée des acides gras dans les mitochondries et leur  $\beta$ -oxydation, ce qui diminue les quantités d'acides gras libres disponibles pour la synthèse hépatique des triglycérides des VLDL, et donc la sécrétion hépatique des triglycérides-VLDL. De plus, les fibrates augmentent l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme responsable de l'hydrolyse des triglycérides, par deux mécanismes: la stimulation de l'expression du gène qui code pour cette enzyme, et la diminution de la synthèse de l'apolipoprotéine CIII (apoCIII), inhibiteur naturel de l'activité de la LPL. Enfin, c'est grâce, en partie, à leur capacité à augmenter la synthèse des apo (*apolipoprotein*)-AI et apoAII, que les fibrates augmentent les concentrations plasmatiques de cholestérol-HDL. L'effet des ligands de PPAR $\alpha$  sur le métabolisme des LDL est en revanche plus modeste. On observe seulement, chez certains patients traités par les fibrates, une diminution du cholestérol-LDL. Cependant les LDL, qui acquièrent moins de triglycérides des VLDL, subissent une action limitée de la lipase hépatique, et leur taille diminue peu. Le nombre de LDL de petite taille diminue donc au profit des LDL de grande taille, moins athérogènes.

### 4. 2. 2. PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$ , à l'inverse de PPAR $\alpha$ , contrôle positivement des gènes impliqués dans la lipogenèse et fait partie intégrante du processus de différenciation adipocytaire (Rosen et coll., 1999). Lorsque la quantité moyenne d'énergie absorbée est supérieure à la quantité

moyenne d'énergie consommée, l'excédent est mis en réserve dans le tissu adipeux blanc (triglycérides) et le foie (glycogène). L'excès de stockage sous forme de lipides dans le tissu adipeux blanc, caractéristique de l'obésité, fait intervenir à la fois une augmentation de la taille (hypertrophie) et du nombre (hyperplasie) des adipocytes. PPAR $\gamma$  est un élément-clé dans ce processus, qui régit à la fois la différenciation du tissu adipeux blanc et la lipogenèse. Deux observations ont initialement suggéré le rôle de PPAR $\gamma$  dans la différenciation des adipocytes: la première est l'expression élevée de ce récepteur dans le tissu adipeux blanc, et la deuxième est l'augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$  dans des lignées cellulaires pré-adipocytaires, qui précède celle de marqueurs de différenciation adipocytaires (Tontonoz et coll., 1994).

#### **4. 2. 3. PPAR $\beta$**

Ce facteur de transcription est apparu comme un acteur potentiel de la cascade de différenciation adipocytaire (Bastie et coll., 1999). Les fonctions de PPAR $\beta$  sont encore mal connues. Cependant, ce récepteur est exprimé en quantité significative dans le tissu adipeux blanc, et son expression augmente au cours des étapes initiales de la différenciation de pré-adipocytes en culture (Amri et coll., 1995). Son expression ectopique dans une lignée de fibroblastes murins suggère que PPAR $\beta$  pourrait être un acteur précoce du processus de différenciation adipocytaire. Dans ce modèle, la différenciation des cellules en adipocytes n'est obtenue que si des activateurs de PPAR $\beta$  et PPAR $\gamma$  sont présents. L'activation de PPAR $\beta$ , par des acides gras à longue chaîne, conduit à une augmentation de l'expression de PPAR $\gamma$ , dont l'activité serait alors nécessaire à la différenciation finale de ces fibroblastes en adipocytes (Bastie et coll., 1999). Il est dès lors tentant de penser que PPAR $\beta$  pourrait être impliqué dans l'augmentation du nombre de cellules adipeuses observée sous l'effet d'un régime riche en graisses. Chez la souris, l'ablation de deux allèles du gène codant pour PPAR $\beta$  semble induire une légère diminution de la masse adipeuse ; PPAR $\beta$  pourrait donc jouer un rôle dans le développement du tissu adipeux blanc *in vivo*, sans toutefois être indispensable (Peters et coll., 2000).

#### **4. 3. PPAR et inflammation**

Le rôle anti-inflammatoire de PPAR $\alpha$  avait été suggéré par Devchand et coll., (1996), qui montraient que le LTB<sub>4</sub> (leucotriène B<sub>4</sub>), un eicosanoïde pro-inflammatoire, était un

ligand de PPAR $\alpha$  impliqué dans la régulation de la dégradation oxydative des acides gras et de leurs dérivés, dont le LTB4 lui-même. L'effet pro-inflammatoire du LTB4 est donc contrecarré par la stimulation de sa propre dégradation par la voie de PPAR $\alpha$ . On sait maintenant que les agonistes de PPAR $\alpha$  diminuent la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, et réduisent *in vivo* la concentration de certaines cytokines inflammatoires.

L'effet des ligands de PPAR $\gamma$  sur l'inflammation est plus nuancé: des études ont montré que les ligands de PPAR $\gamma$  inhibent la production par les monocytes/macrophages de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Jiang et coll., 1998) et IL-12 (Chung et coll., 2000), alors qu'une autre équipe a montré que des ligands synthétiques spécifiques de PPAR $\gamma$  n'avaient aucun effet sur la production de TNF $\alpha$  et IL-6 (Thieringer et coll., 2000). Une autre étude a suggéré que les effets anti-inflammatoires de certains ligands synthétiques seraient également indépendants de PPAR $\gamma$  (Chawla et coll., 2001). Ces derniers résultats sont cependant à nuancer, les auteurs ayant utilisé des concentrations supra-pharmacologiques connues pour induire l'apoptose des macrophages (Chinetti et coll., 1998). Les ligands des PPARs diminuent la production de monoxyde d'azote (NO), un puissant vasorelaxant, par inhibition de la transcription d'une enzyme impliquée dans sa synthèse, la NO synthase inducible (Ricote et coll., 1998 ; Colville-Nash et coll., 1998). Il semblerait que le mécanisme général d'action anti-inflammatoire des ligands des PPARs soit la trans-répression sur des voies NF- $\kappa$ B, STAT et AP-1 (Ricote et coll., 1998 ; Chung et coll., 2000 ; Delerive et coll., 2001).

*Le rôle des PPARs ne peut donc plus être réduit à leur effet sur le métabolisme lipidique. Par des stimuli endogènes et pharmacologiques, ils modulent aussi la réponse inflammatoire et sont impliqués dans d'autres maladies chroniques telles que le diabète, l'obésité ou le cancer.*

#### **4. 4. Hypothèse d'implication de PPAR $\alpha$ dans le diabète gestationnel et la macrosomie**

Nous avons constaté que PPAR $\alpha$  intervient dans le catabolisme des acides gras. Par ailleurs, des études récentes ont montré que les activateurs de PPAR $\alpha$  peuvent jouer sur la



régulation des réponses inflammatoires en inhibant la production de l'IL-2 et la prolifération des lymphocytes T (Marx et coll., 2001). *Étant donné que le diabète gestationnel et la macrosomie sont des pathologies associées à une perturbation du métabolisme lipidique et caractérisées par un état inflammatoire marqué par l'activation des cellules T, nous avons voulu savoir si ce récepteur PPAR $\alpha$  est impliqué dans l'induction de la différenciation des cellules T, chez des souris gestantes diabétiques et leurs progénitures.*

## DEUXIEME PARTIE: RESULTATS

## Liste des Publications et Communications

### Publications

1. **Atègbo JM**, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, and Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4137-4143.
2. Yessoufou A, **Atègbo JM**, Girard A, Prost J, Dramane KL, Moutairou K, Hichami A, and Khan NA. Cassava enriched diet is not diabetogenic rather it aggravates diabetes in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 579-586.
3. Grissa O, **Atègbo JM**, Yessoufou A, Tabka Z, Miled A, Jerbi M, Dramane KL, Prost J, Moutairou K, Hichami A, and Khan NA. Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and their macrosomic offspring. *Translational Research* 2007; 150: 164-171.
4. **Atègbo JM**, Yessoufou A, Moutairou K, Dramane KL, et Khan NA. Modifications physiologiques et immunologiques dans le diabète gestationnel et la macrosomie: existe-t-il le rôle d'une "mémoire métabolique" *in utero*? (Soumis).
5. Yessoufou A, **Atègbo JM**, Eugène Attapka, Aziz Hichami, Moutairou K, Dramane KL, et Khan NA. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  gene modulates pancreatic transcriptional factors and inflammation in adipose tissues in normal and hyperglycaemic mice. (Soumis).
6. Yessoufou A, **Atègbo JM**, Moutairou K et Khan NA. Malnutrition-modulated diabetes mellitus (MMDM): a state of review. *International Journal of Biological and Clinical Sciences* 2008; (2)2: 230-238.

### Communications

- 1- Yessoufou A, **Atègbo JM**, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, and Khan NA. Implication de PPAR-alpha dans la modulation du métabolisme des lipides dans le diabète gestationnel et la macrosomie. Communication orale au 11<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs des 9 et 10 Juin 2005 à Dijon, Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé-Université de Bourgogne, Dijon, France.

- 2- Yessoufou A, Aires V, *Atègbo JM*, El-Yassimi A, Plé AML, Simonin AM, Dramane KL, Moutairou K, Hichami A and Khan NA. Maternal diabetes and obese offspring: Beneficial effects of omega-3 fatty acids.: **Communication affichée au 1<sup>er</sup> Congrès International de VITAGORA : Santé et Nutrition: de la Recherche à la Clinique, du 2 au 4 Mars 2006 à Dijon, France.**
  
- 3- Grissa O, *Atègbo JM*, Kasdallah-Grissa A, Jerbi M, Miled AH, Bibi M, Khan NA and Tabka Z. Activité de la superoxide dismutase et taux des vitamines A, E et C chez les nouveau-nés macrosomiques. « Association Tunisienne des Sciences Biologiques » : **Communication affichée à la 17<sup>ème</sup> Journée Biologique du 20 au 23 Mars 2006 (Hammamet, Tunisie).**
  
- 4- Grissa O, *Atègbo JM*, Kasdallah-Grissa A, Jerbi M, Miled AH, Bibi M, Khan NA and Tabka Z. Antioxidant status in macrosomic babies of women with gestational diabetes. **Communication affichée au Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique du 10 au 12 Avril 2006 (Montpellier, France).**
  
- 5- *Atègbo JM*, Grissa O, Yessoufou A, Tabka Z, Miled AH, Moutairou K, Jerbi M, Dramane KL, Hichami A, and Khan NA. Antioxidant status and circulating lipids are altered in gestational diabetes and their macrosomic offspring. **Communication affichée au Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique du 10 au 12 Avril 2006 (Montpellier, France).**
  
- 6- *Atègbo JM*, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Jerbi M, Tabka Z, and Khan NA. Modulation des adipokines et différenciation des cellules T au cours du diabète gestationnel et la macrosomie. **Communication affichée au XII<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs des 8 et 9 Juin 2006 (Besançon, France).**
  
- 7- Yessoufou A, Aires V, *Atègbo JM*, El-Yassimi A, Plé AML, Simonin AM, Dramane KL, Moutairou K, Hichami A, and Khan NA. Omega-3 fatty acids modulate antioxidant status and T cell activation in diabetic pregnancy and obesity. **Communication affichée au 7th Congress of the International Society for the Study of Fatty acids & Lipids (ISSFAL 2006), 23-28 July 2006 at Cairus Convention Centre, Cairus, Queensland, Australia.**
  
- 8- *Atègbo JM*, Yessoufou A, Moutairou K, Hichami A, Dramane KL, and Khan NA. Modulation des adipokines et des cytokines au cours du diabète gestationnel et la macrosomie. **Communication orale présentée au 3<sup>ème</sup> Café Scientifique de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) du 27 Octobre 2006 (Cotonou, Bénin).**

- 9- *Atègbo JM*, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, and Khan NA. Modulation of Adipokines and Cytokines in Gestational Diabetes and Macrosomia. **Communication affichée au 33<sup>rd</sup> Indian Immunology Society Conference, Theme: Molecular and Clinical Immunology in Health and Diseases. Jawaharlal Nehru Auditorium, AIIMS, 28th January, 2007 to 31st January, 2007, New Delhi, India.**
- 10- Grissa O, *Atègbo JM*, Miled AH, Jerbi M, Khan NA, and Tabka Z. Growth Factors are altered in human gestational diabetes and their macrosomic offspring. **Communication affichée au Second International Congress of Applied Chronobiology and chronomedicine (ICACC). March 23-28, 2007, Tunis. Gammarth, Tunisia.**
- 11-Grissa O, *Atègbo JM*, Miled AH, Jerbi M, Khan NA, and Tabka Z. Activity of adiponectin, leptin and cytokines in diabetic mothers and their macrosomic offspring. **Communication affichée au Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique du 11 au 13 Avril 2007 (Toulouse, France).**
- 12-*Atègbo JM*, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Miled A, Jerbi M, Moutairou K, Dramane KL, Tabka Z and Khan NA. Growth Factors are altered in Human Gestational Diabetes and their Macrosomic Offspring. **Communication affichée au XIII<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs et BIOTechno des 14 et 15 Juin 2007 (Dijon, France).**

**Publication n°1**

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

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

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

*Objectif de l'étude*

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

# Modulation of Adipokines and Cytokines in Gestational Diabetes and Macrosomia

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

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

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

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

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

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

compared with control women. The levels of these adipocytokines were diminished in macrosomic babies in comparison with their age-matched control newborns. Serum concentrations of T helper type 1 (Th1) cytokines (IL-2 and interferon- $\gamma$ ) were decreased, whereas IL-10 levels were significantly enhanced in gestational diabetic mothers compared with control women. Macrosomic children exhibited high levels of Th1 cytokines and low levels of IL-10 compared with control infants. Serum IL-6 levels were not altered between gestational diabetic mothers and control mothers or the macrosomic babies and newborn control babies.

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

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

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

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

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

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

First Published Online July 18, 2006

Abbreviations: BMI, Body mass index; DM, diabetes mellitus; GDM, gestational DM; HbA<sub>1c</sub>, glycosylated hemoglobin; IFN, interferon; Th, T helper.

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

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

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

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

## Subjects and Methods

### Subjects

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

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

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

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

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

### Blood samples

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

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

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

TABLE 1. Characteristics of mothers and their offspring

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

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

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



### Determination of serum adipocytokines, IL-6, and TNF- $\alpha$ levels

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

### Determination of serum cytokine levels

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

### Statistical analysis

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

## Results

### Blood HbA1c, insulin, and glucose levels

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

### Serum lipid levels

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

### Serum adipocytokine levels

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

### Serum T cell cytokine levels

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

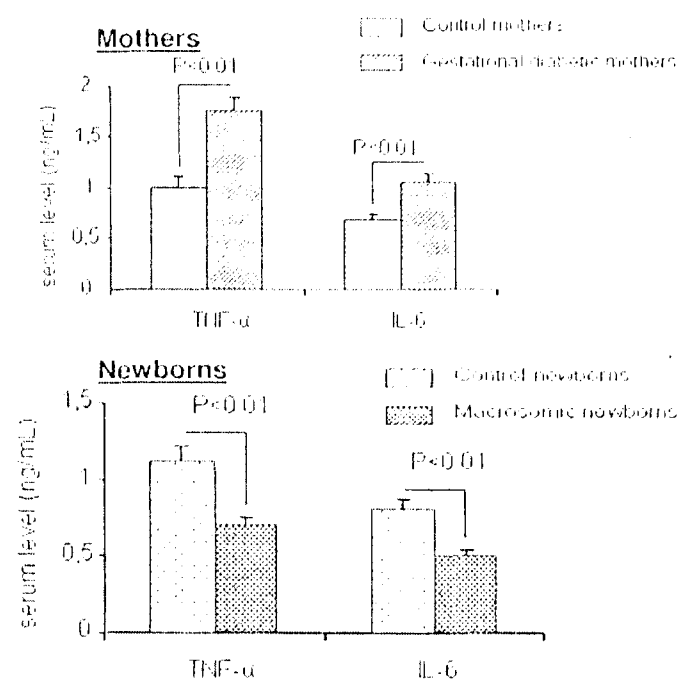


FIG. 1. Serum TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations in gestational diabetic and control women and their newborns. Serum TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations were determined as described in *Subjects and Methods*. Values are means  $\pm$  SD;  $n = 60$  control mothers/babies;  $n = 59$  gestational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

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

## Discussion

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

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

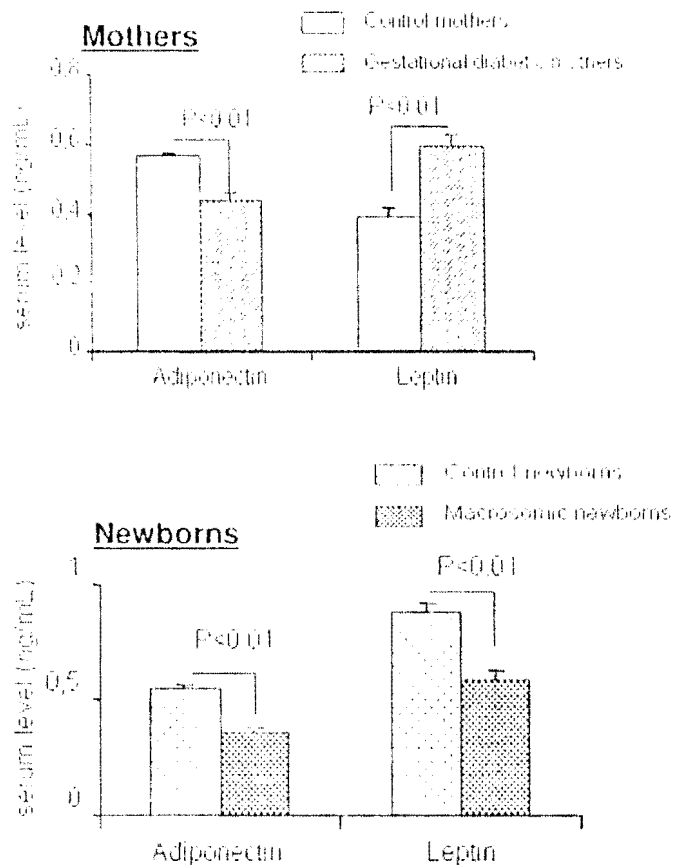


Fig. 2. Serum adiponectin and leptin concentrations in gestational diabetic and control women and their newborns. Serum adiponectin and leptin concentrations were determined as described in *Subjects and Methods*. Values are means  $\pm$  SD;  $n = 60$  control mothers/babies;  $n = 59$  gestational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

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

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

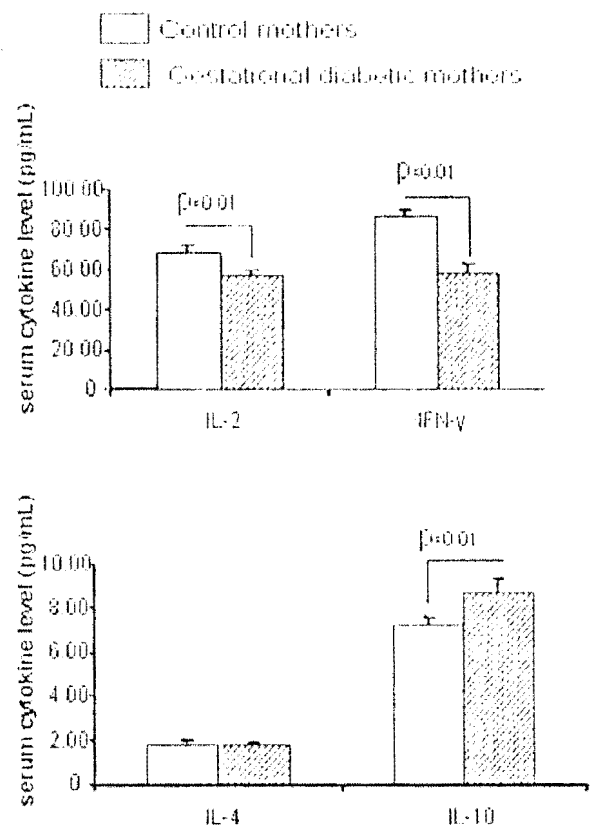


Fig. 3. Serum IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 concentrations in gestational diabetic and control women. Serum Th1 and Th2 cytokine concentrations were determined as described in *Subjects and Methods*. Values are means  $\pm$  SD;  $n = 60$  control mothers;  $n = 59$  gestational diabetic mothers.

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

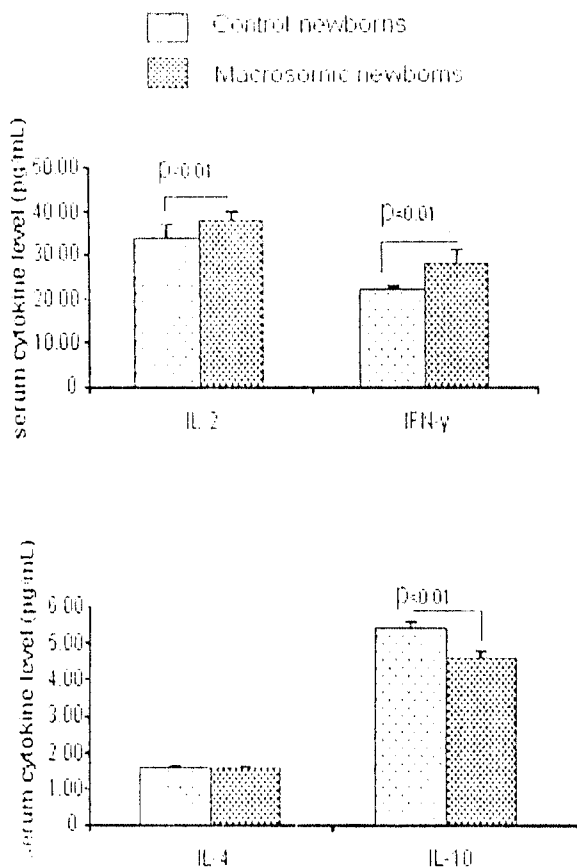


FIG. 4. Serum IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 cytokine concentrations in macrosomic and control newborns. Serum Th1 and Th2 cytokine concentrations were determined as described in *Subjects and Methods*. Values are means  $\pm$  SD; n = 60 control babies; n = 59 macrosomic babies.

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

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

	IL-2/IL-4	IL-2/IL-10	IFN- $\gamma$ /IL-4	IFN- $\gamma$ /IL-10
Control mothers	39.05	9.41	49.87	12.02
GDM mothers	31.61 <sup>a</sup>	6.54 <sup>a</sup>	31.76 <sup>a</sup>	6.57 <sup>a</sup>
Control newborns	20.93	6.22	13.67	4.06
Macrosomic newborns	23.56 <sup>a</sup>	8.18 <sup>a</sup>	17.34 <sup>a</sup>	6.02 <sup>a</sup>

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

<sup>a</sup> Significant difference between diabetic mothers or macrosomic newborns and their corresponding controls: P < 0.01.

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

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

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

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

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

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

### Acknowledgments

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

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

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

### References

- Gabbe S 1986 Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 315:1025–1026
- Kim C, Newton KM, Knopp RH 2002 Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25:1862–1868
- Cox NJ 1994 Maternal component in NIDDM transmission. How large an effect? *Diabetes* 43:160–168
- Grossberg AS, McDaniel ML 2002 Identifying the links between obesity, insulin resistance and  $\beta$ -cell function: potential role of adipose-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 32:24–34
- Diez JJ, Iglesias P 2003 The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human and possible biological roles. *Eur J Endocrinol* 148:293–300
- Coppack SW 2001 Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 60:349–356
- Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepereq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM 2002 TNF- $\alpha$  is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes* 51:2207–2213
- Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melzer Z, Speer G, Hajos P, Salamon F, Turi Z, Kovacs M, Vargha P, Karadi I 2002 Tumour necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 56:93–99
- Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T 1998 Tumour necrosis factor- $\alpha$  in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2907–2910
- Cseh K, Baranyi E, Melzer Z, Csakany GM, Speer G, Kovacs M, Gero G, Karadi I, Winkler G 2002 The pathophysiological influence of leptin and the tumor necrosis factor system on maternal insulin resistance: negative correlation with anthropometric parameters of neonates in gestational diabetes. *Gynecol Endocrinol* 16:453–460
- Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Biegelmayer C, Schneider B, Ludvik B, Prager R, Waldhausl W 2001 Increased plasma leptin in gestational diabetes. *Diabetologia* 44:164–172
- Simmons D, Breier BH 2002 Fetal overnutrition in Polynesian pregnancies and in gestational diabetes may lead to dysregulation of the adipoinular axis in offspring. *Diabetes Care* 25:1539–1544
- Festa A, Shnawa N, Krugluger W, Hopmeier P, Scherthner C, Haffner SM 1999 Relative hypoleptinaemia in women with mild gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 16:656–662
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196–4200
- Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jaidel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B 2000 Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2084–2089
- Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Bart D 1997 NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40:1286–1292
- Müller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H 2002 Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF- $\alpha$  or its receptors. *Diabetologia* 45:805–812
- Rabinovitch A 1994 Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 43:613–621
- Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH 2000 Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21:479–483
- Wood SC, Rao TD, Frey AB 1999 Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. *Cell Immunol* 192:1–12
- Kaplan LA, Cline D, Gartside P, Burstein S, Sperling M, Stein EA 1982 Hemoglobin A1 in hemolysates from healthy and insulin-dependent diabetic children, as determined with a temperature-controlled minicolumn assay. *Clin Chem* 28:13–18
- Catalano PM, Kirwan JP, Hauguel-de Mouzon S, King J 2003 Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *J Nutr* 133:1674–1683
- Kurishita M, Nakashima K, Kozu H 1994 A retrospective study of glucose metabolism in mothers of large babies. *Diabetes Care* 17:649–652
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A 2004 Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25:4–7
- Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R 2005 Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111:1448–1454
- Sternberg EM 1992 The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 117:854–866
- Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P 2000 Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2970–2973
- Trayhurn P, Wood SI 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Brit J Nutr* 92:347–355
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y 1999 Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257:79–83
- Meller M, Qiu C, Vadachkoria S, Abetew DF, Luthy DA, Williams MA. Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. *Physiol Res* 2005 Dec 12 [Epub ahead of print]
- Hotamisligil GS, Murraay DL, Choy LN, Spiegelman BM 1994 Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits signalling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4854–4858
- Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JE, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA 2002 Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 51:1884–1888
- Ruan H, Lodish HF 2003 Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cytokine Growth Factor Rev* 14:447–455

34. Tihn AS, Richelsen B, Pedersen SB, Haugaard SB, Rathje GS, Madsbad S, Andersen O 2003 Increased expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in HAAS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E1072–E1080
35. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, Lee YH, IT Huang, SC Ho, CH Chu 2005 Maternal adiponectin concentrations at 24 to 31 weeks of gestation: negative association with gestational diabetes mellitus. *Nutr* 21:1095–1099
36. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold I, Friedman JM 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425–432
37. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543–546
38. McLachlan KA, O'Neal D, Jenkins A, Alford FP 2006 Do adiponectin, TNF  $\alpha$ , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* 22:131–138
39. Sivan E, Whittaker PG, Sinha D, Honiko CJ, Lin M, Reece EA, Boden G 1998 Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *Am J Obstet Gynecol* 179:1128–1132
40. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K 1997 Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029–1033
41. Yan S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S 2005 Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 1:371–378
42. Matarese G, La Cava A, Sanna V, Iord GM, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S 2002 Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol* 23:482–487
43. Weiss R, Dufour S, Groszmann A, Petersen K, Dziura J, Taksali SE, Shulman G, Caprio S, Weiss R, Dufour S, Groszmann A, Petersen K, Dziura J, Taksali SE, Shulman G, Caprio S 2003 Low adiponectin levels in adolescent obesity: a marker of increased intramyocellular lipid accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2014–2018
44. Montague G, Prins JB, Sanders I, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S 1998 Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 47:1384–1391
45. Raghupathy R 2001 Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol* 13:219–327
46. Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV 1998 Shifts in the Th1/Th2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun* 245:933–938
47. Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A 2006 N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. *J Autoimmun* 26:268–277
48. Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA 2006 PPAR $\alpha$  deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: modulation of T cell differentiation. *Endocrinology* 147:4410–4418
49. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, Link AA, Dimitrov MA, Fisher S, Crane M, Kanik KS, Chrousos GP 2001 IL-12, TNF- $\alpha$ , and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4933–4938
50. Volk T, Dopfner UR, Schnitzler M, Rimpau S, Schnitzler H, Konertz W, Hoefflich C, Döcke WD, Spies CD, Volk HD, Kox WJ 2003 Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. *Cytokine* 24:237–243
51. Giordano C 1990 Immunobiology of normal and diabetic pregnancy. *Immunol Today* 11:301–303
52. Roll U, Scheeser J, Standl E, Ziegler AG 1994 Alterations of lymphocytes subsets in children of diabetic mothers. *Diabetologia* 37:1132–1141
53. Guermouche B, Yessoufou A, Soulimane N, Merzouk H, Moutairou K, Hichami A, Khan NA 2004 N-3 fatty acids modulate T-cell calcium signaling in obese macrosomic rats. *Obes Res* 12:1744–1753
54. Lapolla A, Dalfrà MG, Sanzari M, Fedele D, Betterle C, Masin M, Zanchetta R, Faggian D, Massolli M, Nucera V, Plebani M 2005 Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine* 31:280–287
55. Merzouk H, Khan NA 2003 Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects? *Clin Sci* 105:519–529

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

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

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

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

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

#### **Résumé:**

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

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

*Publication n°2*

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

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

*Translational Research* 2007; **150** : 164-171

*Objectif de l'étude*

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

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

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

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

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

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

**G**estational diabetes mellitus (GDM) is the most frequent metabolic disorder of pregnancy, occurring in 1% to 10% of all pregnancies.<sup>1</sup> As far as the African subcontinent is concerned, Djrolo et al<sup>2</sup> have observed a prevalence of

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

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

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

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

1931-5244/\$ – see front matter

© 2007 Mosby, Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.trsl.2007.03.007



ducted in Tunisia by Khrouf et al<sup>3</sup> has shown an incidence of 7.75% of GDM. The major complications of GDM include maternal hypertensive disorders, neonatal hypoglycemia, jaundice and birth trauma including shoulder dystocia.<sup>4</sup> Although great controversy exists regarding the clinical outcome of GDM,<sup>5</sup> it is clear that several morbidities occur with an increased frequency in offspring of gestational diabetic mothers. The most commonly reported effect on the newborn is macrosomia, which is usually defined as birth weight above either 4 kg or birth weight above the 95th percentile for the gestational age. Available evidence indicates an association between maternal hyperglycemia during pregnancy and childhood obesity.<sup>6</sup> In fact, several alterations in carbohydrate and lipid metabolism are also observed in infants of diabetic mothers and are thought to be a consequence of maternal hyperglycemia leading to fetal hyperglycemia and hyperinsulinemia.<sup>7-9</sup> High blood glucose levels in these newborns induce oxidative stress, which in turn evokes the production of highly reactive oxygen radicals, toxic to cells, particularly to the plasma membranes where these radicals interact with the lipid bilayer.<sup>10</sup>

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

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

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

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

## MATERIALS AND METHODS

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

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

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

Table 1. Characteristics of mothers and their offspring

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

Note: Values are means ± SDs.

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

for gestational diabetes, including normal glucose tolerance tests during the first and third trimesters of pregnancy. An attempt was made to match these women to diabetic subjects, at least regarding maternal age, BMI as determined by the weight and height of patients, parity, gestational age, and mode of delivery. Both diabetic and control mothers were offered regular examinations of their offspring. The characteristics of mothers and newborns are shown in Table 1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

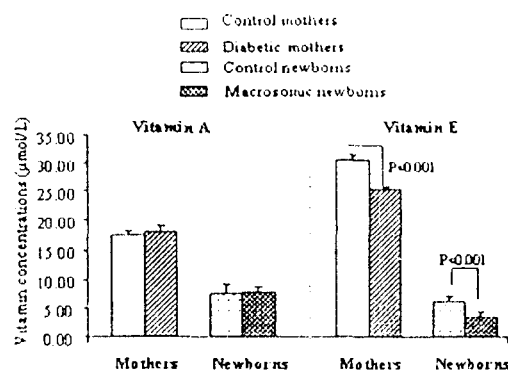
**Serum antioxidant defense.** Serum resistance to free radical aggression was tested as the capacity of red blood cell (RBC) to withstand free radical-induced hemolysis and was measured as per method of Blache and Prost,<sup>21</sup> who have clearly demonstrated that, if at least 1 component of the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

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

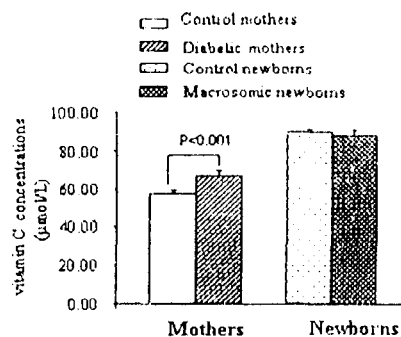
## RESULTS

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

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



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



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

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

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

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

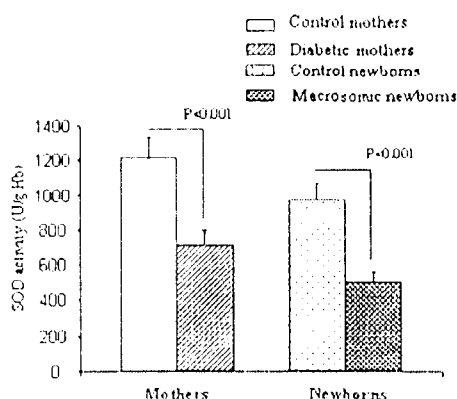


Fig 3. Erythrocyte SOD activity in control and diabetic women and their newborns. Erythrocyte SOD activity was determined as described in the Materials and Methods section. Values are means  $\pm$  SDs.  $n = 60$  control mothers/babies;  $n = 59$  diabetic mothers/macroscopic babies. Each value represents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

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

## DISCUSSION

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

without any significant modifications in their macroscopic offspring compared with respective control subjects. There have been conflicting reports on plasma vitamin concentrations in diabetes mellitus. Yessoufeu et al<sup>10</sup> have shown, in type 2 diabetic patients, diminished vitamin E levels. On the other hand, Makimattila et al<sup>27</sup> have reported that plasma vitamins C and E levels in type 2 diabetic patients were not significantly decreased. Sundarm et al<sup>28</sup> have reported low levels of vitamins E and C in diabetic patients. However, the findings of the current study are in close agreement with those obtained by Peuchant et al<sup>19</sup> who have observed that plasma levels of vitamin E were significantly lower in pregnant women with GDM compared with control subjects, without any changes in vitamin A. We have previously suggested that the decreased level of vitamin E<sup>23</sup> could be from its high utilization rate as this vitamin may be used to protect against oxidative stress. It has been established that oxidative stress is induced by both the increases in free radicals and the disturbance in the free radical scavenging system in diabetes mellitus.<sup>13,29</sup> The inverse corelationship between a decreased level of vitamin E and a high level of vitamin C, in GDM mothers, may be because vitamin C and reduced glutathione regenerate vitamin E.<sup>13,30</sup> Low levels of vitamin E are correlated with hyperglycemia in GDM mothers. It has been reported that chronic hyperglycemia may increase oxidative stress, which may account for low vitamin E levels.<sup>24</sup> In addition, diminished vitamin E levels have also been observed in diabetic patients with increased lipid peroxidation products associated with hypertriglyceridaemia.<sup>31</sup> In the current study, the high level of vitamin C in GDM mothers may be caused by hyperglycemia in these subjects. Indeed, it has been shown that L-ascorbate (vitamin C) is synthesized from glucose by the D-glucuronic acid pathway in mammals.<sup>32</sup>

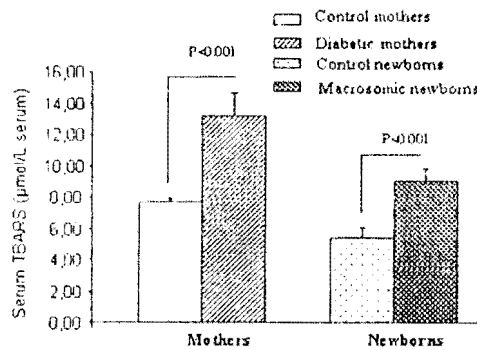
As far as the antioxidant enzymes are concerned, the current study showed that SOD activity decreased in gestational diabetic mothers and their macroscopic offspring compared with healthy controls. Our results are in accordance with those obtained by other investigators in human beings and experimental studies. Biri et al<sup>33</sup> and Chaudhari et al<sup>34</sup> have observed an impaired SOD activity in pregnant women with GDM compared with normal pregnant women. Similar results have been observed by Peuchant et al<sup>19</sup> who have shown a decreased SOD activity in gestational and type 1 diabetic pregnant women. Other investigators<sup>10,35-37</sup> have also noticed decreased SOD activity in human type 2 diabetes compared with controls. We have also observed a decrease in SOD activity in diabetic rats and their macroscopic offspring.<sup>25</sup> Dincer et al<sup>38</sup> have observed a diminished SOD activity in liver and lung of neonate

**Table II.** Serum lipid concentrations

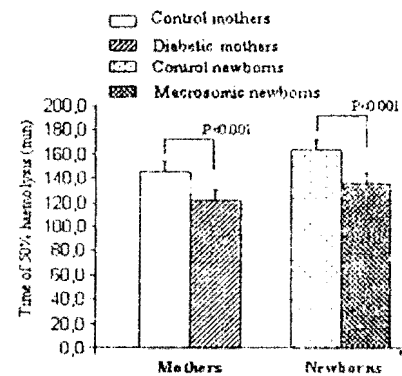
Serum lipids	Mothers		Newborns	
	Control n = 60	Diabetic n = 59	Control n = 60	Macroscopic n = 59
Triglycerides (mM)	3.07 ± 0.22	3.07 ± 0.25	1.02 ± 0.04	1.30 ± 0.04*
Total-cholesterol (mM)	6.33 ± 0.32	5.37 ± 0.65	0.83 ± 0.21	1.34 ± 0.17*
Free-cholesterol (mM)	12.11 ± 0.34	9.30 ± 0.93*	6.66 ± 0.30	7.55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

Note: Values are means ± SDs.

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



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



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

streptozotocin-induced diabetic rats. However, Aydin et al<sup>39</sup> have reported that SOD activity increased in type 2 diabetes compared with controls. Ruiz et al<sup>40</sup> did not observe any significant difference in SOD activity in type 1 diabetes compared with controls. The reason for this discrepancy in SOD activity in diabetes might be attributed to the treatments given to the patients, the associated complications, and the duration of the disease.<sup>10,23,41,42</sup> As far as SOD activity in macrosomia is concerned, only one study has shown diminished SOD activity in infants born to gestational diabetic mothers and our results are substantiated by this report.<sup>43</sup>

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

High lipids and increased oxidative stress in diabetic patients might have enhanced the susceptibility of lipid peroxidation. Gestational diabetic mothers and their macrosomic offspring exhibited a significant increase in serum TBARS in accordance with the observations of several authors.<sup>46,47</sup> Our finding implies that TBARS are one promising clinical marker of oxidative stress. Bis-Gluchowska et al<sup>48</sup> have also shown a high level of TBARS in the cord blood of newborns delivered to mothers with type 1 diabetes, which suggests that maternal diabetes during pregnancy may induce oxidative stress in the newborn. On the other hand, Mazzanti et al<sup>49</sup> have reported that basal levels of peroxidation of the platelet membranes and TBARS levels were increased in GDM patients in comparison with control subjects; hence, oxidative stress in GDM women might be involved in cellular dysfunction. In fact, lipid peroxidation has been involved in a variety of physiological, pathological, and clinical conditions, including pregnancy-related complications, mainly in preeclampsia and diabetes.<sup>47</sup>

Our report is the first one on antioxidant status in macrosomia related to human GDM. The altered antioxidant defense observed in these macrosomic infants at birth could cause metabolic disorders during their adulthood. Indeed, we have previously reported, in rats,<sup>25</sup> the potential long-term consequences of the altered antioxidant status in macrosomic offspring born to diabetic dams. Hence, the antioxidant status of macrosomic offspring, during adulthood, remained low. At 2 and 3 months of age, they exhibited (1) hyperglycemia and hyperinsulinemia, (2) high plasma TBRAS levels, (3) diminished plasma oxygen radical absorbance capacity that reflects the low antioxidant defense, (4) low vitamins C and A concentrations, and (5) the decreased activities of SOD and other antioxidant enzymes like glutathione peroxidase and glutathione as compared with the control adult offspring. Other investigators<sup>35</sup> have also shown in human macrosomic infants that macrosomia was associated with alterations in lipoprotein compositions and concentrations at birth, and some of them persisted even after 1 month of life; hence, they might play a role in the pathogenesis of diabetes and atherosclerosis at adulthood. These investigators also reported that macrosomic newborns as compared with controls had higher serum lipids, apolipoprotein A-I and B-100, and lipoprotein (very low-density lipoprotein, low-density lipoprotein, high-density lipoprotein-2, and high-density lipoprotein-3) levels. By keeping in view these alterations, one can envisage the complementary therapies with antioxidants, including vitamins that might protect the organism against the production of free radicals and the decrease in antioxidant capacity. Such treatments may be beneficial in women at risk of GDM.

## REFERENCES

- Gabbe S. Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1986;315:1025-6.
- Djrolo F, Megnigbeto Obey A, De Souza J, Takpara I, Santos P, et al. Influence of maternal weight on pregnancy outcome in Cotonou (Benin). *J Gynecol Biol Reprod* 2002;31:243-7.
- Khrouf N, Tabka Z, Becher SB, Miled SB, Hamza B. Fetal macrosomia and the study of risk factors in maternal diabetes. *Arch Fr Pediatr* 1983;40:815-7.
- Coustan DR. Gestational diabetes: a continuum of risk. *Eur J Endocrinol* 1997;137:13-4.
- Hunter DJS, Keirse MJNC. Gestational diabetes. In: Chalmers I, Enkin M, Keirse MJNC, eds. *Effective care in pregnancy and childbirth*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1989:403-10.
- Petitt DJ, Nelson RG, Saad MF, Bennett PH, Knowler WC. Diabetes and obesity in the offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. *Diabetes Care* 1993;16:310-4.
- Silverman BL, Landsberg L, Metzger BE. Fetal hyperinsulinism offspring of diabetic mothers: association with the subsequent development of childhood obesity. *Ann NY Acad Sci* 1993;699:36-45.
- Hertel J, Kuhl C. Metabolic adaptation during the neonatal period in infants of diabetic mothers. *Acta Endocrinol* 1986;277:136-40.
- Omoy A, Zaken V, Kohen R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzyme and low-molecular-weight antioxidant (LMWA) may be the causative factor increased anomalies. *Teratology* 1999;60:376-86.
- Yessoufou A, Moutairou K, Girard A, Fatoke M, Prost J, Ahissou H, et al. Antioxidant status in alcohol-related diabetes mellitus in Beninese subjects. *Cell Mol Biol* 2005;51:849-58.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18:872-9.
- Evans P, Halliwell B. Free radicals and ageing. Cause, consequence, and criteria [review]. *Ann NY Acad Sci* 1999;884:19-40.
- Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Comte M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:373-81.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci* 2000;899:136-47.
- Guemouri L, Artur Y, Herbeth B. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991;37:1932-7.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 1995;64:97-112.
- Zaman Z, Fielden P, Frost PG. Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin Chem* 1993;39:2229-34.
- Roe JH, Kuether CA. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 1943;147:399-407.
- Peuchaut E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel JY, et al. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2004;37:293-8.
- Quintanilha AT, Packer L, Szyszlo DJM, Racanelly TI, Davies KJA. Membrane effects of vitamin E deficiency bioenergetic and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria. *Ann NY Acad Sci* 1982;393:32-47.
- Blache D, Prost M. Free radical attack: biological test for human resistance capability. In: Ponnampertuma C, Gehrke CW, eds. *A lunar-based chemical analysis laboratory*. Hampton, VA: Deepak A, 1992:82-98.
- Caimi G, Carollo C, Lo Presti R. Diabetes mellitus: oxidative stress and wine. *Curr Med Res Opin* 2003;19:581-5.
- Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY, Prost J, et al. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetes subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 2003;22:15-27.
- Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autooxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LFM modification by glucose. *Diabetes* 1990;39:1420-4.
- Yessoufou A, Soulimann N, Merzouk SA, Moutairou K, Ahissou H, Prost J, et al. N-3 Fatty acids modulate antioxidant status in rat and their macrosomic offspring. *Int J Obes* 2006;30:739-50.
- Merzouk H, Madani S, Hichami A, Prost J, Belleville J, Khan NA. Age related changes in fatty acids in obese offspring of streptozotocin-induced diabetic rats. *Obes Res* 2002;10:703-14.

27. Makimattila S, Lui ML, Wakkilainen J, Schlenzka A, Lahdempera S, Syvanne M, et al. Impaired epithelium-dependent vasodilatation in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:973-81.
28. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayaligam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type 2 diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 1996;90:255-60.
29. Sinclair AJ. Free radical mechanisms and vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Rev* 1993;2:7-10.
30. Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defence mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 2001;64:33-44.
31. Kajanachumpol S, Komindr S, Mahasirivodom A. Plasma lipid peroxide and antioxidant levels in diabetic patients. *J Med Assoc Thai* 1997;80:372-7.
32. Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis [review]. *Vitam Horm* 2001;61:241-66.
33. Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I. Oxidant status in maternal and cord plasma tissue in gestational diabetes. *Placenta* 2006;27:327-32.
34. Chandhari L, Tandon OP, Vaney N, Agarwal N. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetes. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003;47:441-6.
35. Merzouk H, Madani S, Prost J, Loukidi B, Meghelli-Bouchenak M, Belleville J. Changes in serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions at birth and after 1 month of life in macrosomic infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Eur J Pediatr* 1999;158:750-6.
36. Sekeroglu MR, Sahin H, Dulger H, Algun E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2000;33:669-74.
37. Uzel N, Sivas A, Uysal M, Oz H. Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metabol Res* 1987;19:89-90.
38. Dincer Y, Alademir Z, Ilkova H, Akcay T. Susceptibility of glutathione and glutathione related antioxidant activity to hydrogen peroxide in patients with type 2 diabetes: effect of glycaemia control. *Clin Biochem* 2002;35:297-301.
39. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Ismaier A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001;34:65-70.
40. Ruiz C, Algeria A, Barbera A, Farre R, Lagarde MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type I diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:99-105.
41. Telei A, Cakatav U, Salman S, Satman I, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage type I diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;50:213-23.
42. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
43. Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Kowalska I, Kretowski A, Zarzycki W, et al. Lipid peroxidation, antioxidant defence and acid-base status in cord blood at birth: the influence of diabetes. *Horm Metab Res* 2001;33:227-31.
44. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Nightingale P, Kendall MJ, Brydon P, et al. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci* 2004;106:93-8.
45. Di Gianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Ghio A, Giovannitti MG, et al. Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. *Diabet Med* 2005;22:21-5.
46. Orhan H, Onderoglu L, Yucel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2007;267:189-95.
47. Rajdl D, Racek J, Steinerova A, Novotny Z, Stozicky F, Trefil L, et al. Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. *Physiol Res* 2005;54:429-36.
48. Bis-Gluchowska M, Marciniak B, Szpringer-Bogun E, Rola R, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. Determination of oxidative-peroxidative balance in the cord blood of newborns delivered to mothers with diabetes type G1. *Ginek Pol* 2001;72:1255-8.
49. Mazzanti L, Nanetti L, Vignini A, Rabini RA, Grechi G, Cester N, et al. Gestational diabetes affects platelet behaviour through modified oxidative radical metabolism. *Diabet Med* 2004;21:68-72.

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

Oussama Grissa<sup>1</sup>, **Jean-Marc Atègbo**<sup>2,3</sup>, Akadiri Yessoufou<sup>2,4</sup>, Zouheir Tabka<sup>1</sup>, Abdelhedi Miled<sup>5</sup>, Mehdi Jerbi<sup>6</sup>, Karim L. Dramane<sup>3</sup>, Josiane Prost<sup>2</sup>, Kabirou Moutairou<sup>4</sup>, Aziz Hichami<sup>2</sup>, NaiAkhtar Khan<sup>2</sup>

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

**Résumé :**

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

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



*Publication n°3*

**Modulations physiologiques et immunologiques du diabète gestationnel et de la macrosomie : implication de la programmation *in utero***

**Jean-Marc Atègbo, Akadiri Yessoufou, Kabirou Moutairou, Karim L. Dramane et Naim A. Khan**

**(Soumis)**

*Objectif de l'étude*

Plusieurs études ont démontré l'importance de l'activation du système immunitaire et de l'état inflammatoire chez les sujets obèses et diabétiques de type 2. Le but de cette étude est d'évaluer les modifications physiologiques et immunologiques survenant pendant le diabète gestationnel et la macrosomie et le rôle éventuel d'une "mémoire métabolique" *in utero*.

Titre en Français:

**Modulations physiologiques et immunologiques du diabète gestationnel et de la macrosomie : implication de la programmation *in utero***

*Titre en Anglais:*

**Physiological and immunological modulation in gestational diabetes and macrosomia: implication of *in utero* programming**

*Auteurs:*

**Jean-Marc Atègbo**, Akadiri Yessoufou, Kabirou Moutairou, Karim Laye Dramane, Naim Akhtar Khan

*Affiliations des auteurs:*

JM Atègbo, A Yessoufou, K Moutairou, KL Dramane: Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, BP 526 Cotonou, Bénin.

NA Khan: Université de Bourgogne, UPRES EA 4183 "Lipides & Signalisation Cellulaire", Faculté des Sciences de la Vie, 6 Bd Gabriel, 21000 Dijon, France.

*Correspondance:*

Professeur NA Khan, UPRES EA 4183 "Lipides & Signalisation Cellulaire", Faculté des Sciences de la Vie, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

Tel + 33 3 80 39 63 12. Fax + 33 3 80 39 63 30. E-mail : [n.khan@u-bourgogne.fr](mailto:n.khan@u-bourgogne.fr)

## **Résumé en Français**

### **Modulations physiologiques et immunologiques du diabète gestationnel et de la macrosomie: implication de la programmation *in utero***

Le diabète gestationnel aboutit fréquemment à la macrosomie et à l'obésité fœtale. Il semble que les anomalies du métabolisme des carbohydrates et des lipides, observées chez les bébés macrosomiques nés de mères diabétiques, sont dues à l'hyperglycémie maternelle qui induit l'hyperinsulinémie fœtale. Nous avons développé un modèle animal de macrosomie et avons évalué l'incidence de l'obésité chez ces animaux. Les bébés macrosomiques, issus de mères diabétiques, sont prédisposés à développer, avec l'âge, l'intolérance au glucose, l'insulino-résistance et l'obésité. En outre, les cellules-T des rattes diabétiques et de leurs nouveau-nés macrosomiques semblent présenter un défaut dans la transduction du signal. Il semble que la programmation *in utero* au cours du diabète gestationnel crée une "mémoire métabolique" qui est responsable du développement de l'obésité chez les nouveau-nés macrosomiques et de l'apparition de maladies métaboliques à l'âge adulte.

## **Résumé en Anglais**

### **Physiological and immunological modulation in gestational diabetes and macrosomia: implication of *in utero* programming**

Gestational diabetes frequently results in macrosomia and foetal obesity. It seems that the anomalies in carbohydrate and lipid metabolism in macrosomic infants born of diabetic mothers are due to maternal hyperglycaemia, which leads to fetal hyperinsulinemia. We have developed a rat model of macrosomic offspring and assessed the onset of obesity in these animals. The macrosomic newborns of diabetic mothers are prone to the development of glucose intolerance, insulin resistance and obesity as a function of age. Besides, T-cells of gestational diabetic rats and their macrosomic offspring seem to present a defect in signal transduction. It seems that *in utero* programming during diabetic pregnancy creates a "metabolic memory" which is responsible for the development of obesity in macrosomic offspring and the onset of metabolic diseases in adulthood.

## **Introduction**

Des études épidémiologiques, cliniques et expérimentales ont suggéré que le diabète gestationnel (GDM) représente un important facteur de risque pour la macrosomie foetale qui a été définie comme un poids à la naissance supérieur ou égal au 90<sup>e</sup> percentile pour l'âge gestationnel ou un poids à la naissance > 4 000 g, indépendamment de l'âge gestationnel ou du sexe. La macrosomie est une pathologie plurifactorielle qui constitue, à la fois, un facteur de risque de lésions fœtales et de morbidité maternelle dans le cas du diabète de type 1, de type 2 et de diabète gestationnel [1]. Elle est associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline et une surstimulation des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours de la vie fœtale. À l'âge adulte, ces perturbations peuvent entraîner une insulino-résistance [2] et donc, le syndrome métabolique. La croissance et le développement du fœtus dépendent non seulement des nutriments, mais aussi de l'arrangement génétique et du statut endocrine foeto-maternel. Il est remarquable de noter que plusieurs altérations observées à la naissance, dans le métabolisme des carbohydrates et des lipides chez des enfants issus de mères diabétiques, persistent encore à l'âge adulte [3]. L'hypercholestérolémie maternelle observée au cours de la grossesse est associée à la formation accrue de dépôts graisseux dans les artères fœtales humaines et à l'accélération progressive de l'athérosclérose pendant l'enfance [4]. Les concentrations en insuline *in utero* pourraient aussi affecter l'induction et l'activité de divers enzymes hépatiques associés au métabolisme des lipides et des carbohydrates. Dans la présente revue, nous essayerons d'élucider quelques anomalies pathophysiologiques observées lors de la macrosomie et des complications associées, et l'implication de la programmation *in utero*, au cours du diabète gestationnel, dans l'apparition, à l'âge adulte, de maladies métaboliques. En effet, la programmation *in utero* semble créer une sorte de "mémoire métabolique" puisque les altérations physiologiques et immunologiques observées au cours de la période gestationnelle sont responsables, plus tard, de "l'avènement" de maladies comme le diabète de type 2 et l'obésité [5].

## **Le métabolisme des lipides et des lipoprotéines est altéré chez les macrosomes**

La plupart des anomalies lipidiques observées chez les nouveau-nés macrosomiques sont analogues à celles trouvées chez leurs mères diabétiques. Chez ces bébés, les

concentrations sériques en lipides, lipoprotéines et apoB100 sont plus élevées que celles des bébés issus de mères en bonne santé [6]. Dans le but de comprendre le rôle du métabolisme lipidique dans l'étiopathologie de la macrosomie, nous avons développé dans notre laboratoire un modèle animal. Il a été démontré que l'administration de streptozotocine (STZ), avant la grossesse, affecte la fertilité et altère le développement de l'embryon pendant la période de pré-implantation [7]. Pour cette raison, dans notre modèle, nous avons injecté, à des ratte Wistar femelles, par voie intrapéritonéale, une dose unique de 40 mg/kg de poids corporel de STZ, au 5<sup>e</sup> jour de la gestation et n'avons observé aucun effet délétère sur le développement de l'embryon. Cette dose unique a été choisie après plusieurs essais préliminaires (*résultats non publiés*) au cours desquels nous avons remarqué que de faibles doses de STZ ne permettaient pas d'obtenir un bon modèle de diabète gestationnel, à cause de la grande variabilité des taux de glucose et de l'absence de macrosomie fœtale. Dans le but d'éviter l'interférence des hormones reproductrices femelles qui sont associées à la prévalence, la susceptibilité et la sévérité de maladies autoimmunes [8], seuls les mâles macrosomiques ont été inclus dans l'étude.

Les ratte gestantes sont d'excellents modèles expérimentaux parce qu'elles montrent, au cours de la gestation, une augmentation de VLDL-TAG similaire à celle trouvée chez les humains. La surproduction de VLDL, une caractéristique commune à l'obésité humaine et aux différentes obésités expérimentales, est une conséquence directe de l'hyperinsulinémie et de l'hyperlipogénèse hépatique [9]. La première observation importante apparente à l'âge de 3 mois, c'est-à-dire à l'âge adulte, est que ces rats prennent progressivement du poids et leur gain pondéral est significativement plus élevé que celui des rats contrôles [10]. En outre, ils sont hyperglycémiques et hyperinsulinémiques, avec des concentrations élevées en lipide et lipoprotéine. Ces rats obèses présentent aussi une augmentation significative des lipides hépatiques, LCAT, LPL, HTGL, et des activités de l'ACAT (*acyl Co-A cholesterol acyl transferase*), de l'HMG-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA*) réductase et de la 7 $\alpha$ -hydroxylase. Pris ensemble, ces résultats suggèrent fortement que ces rats développent à l'âge adulte une insulino-résistance.

La macrosomie fœtale retrouvée chez les nouveau-nés de mères GDM, influence le métabolisme des lipides et des lipoprotéines à la naissance et surtout à l'âge adulte. La macrosomie observée au cours du diabète gestationnel constitue un important facteur de

risque d'obésité à l'âge adulte, de diabète et d'autres complications métaboliques, incluant les anomalies du métabolisme des acides gras essentiels et la dyslipoprotéinémie.

### **L'immunité à médiation cellulaire est altérée au cours du diabète gestationnel et la macrosomie**

Il a été démontré que les anomalies observées, dans l'immunité à médiation humorale et cellulaire, chez des femmes diabétiques de type 1, persistaient pendant la grossesse et, en outre, compliquaient l'immunité fœtale. Peu d'études concernant l'activation des cellules-T au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie sont disponibles, puisque ces deux pathologies sont multifactorielles. En fait, la totalité des cellules-T activées a été détectée dans le cordon ombilical sanguin des enfants et des mères diabétiques de type 1 mais pas chez des enfants issus de mères normales [11]. Chez les êtres humains, de la naissance jusqu'à l'âge de 15 ans, le pourcentage des cellules-T totales était plus élevé chez les enfants de mères diabétiques de type 1 que chez ceux des mères ne souffrant pas de diabète. Une augmentation des lymphocytes positifs du CMH de classe II a été observée chez des enfants de mères diabétiques de type 1 comparés aux contrôles [12]. Aussi, les nouveau-nés de mères diabétiques de type 1 montraient une réduction significative des lymphocytes NK (*Natural killer*), indiquant un déficit de l'immunité naturelle à la naissance, et une augmentation du nombre de cellules T CD4<sup>+</sup>. Les mères GDM avaient des taux élevés de lymphocytes totaux et de cellules CD8<sup>+</sup> exprimant TCR gamma/delta, et de faibles taux de CD3 exprimant TCR alpha/bêta comparées aux contrôles; aussi, leurs bébés présentaient des valeurs plus élevées en CD8<sup>+</sup> que les bébés témoins [13].

Nous avons noté, à la fois dans le pancréas et la rate de rattes GDM, une diminution de l'expression des ARNm de IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  [14], bien qu'il ait été démontré, par ailleurs, que la progression du diabète de type 1 soit étroitement associée à une forte expression des ARNm des cytokines Th1, particulièrement de l'IFN- $\gamma$ . De même, les rattes GDM présentaient une diminution de l'IFN- $\gamma$  circulant, mais des taux élevés de l'IL-10, comparées aux rattes témoins. La faible expression du phénotype Th1 chez les rattes GDM pourrait être due au fait que, pendant la grossesse, les cytokines Th1 diminuaient alors que les cytokines Th2 augmentaient [15]. En fait, le changement du phénotype Th1 en Th2, au cours de la grossesse, permettait la production intense d'anticorps qui combattent non seulement les infections mais aussi offrent une immunité passive au fœtus [16].

Le diabète gestationnel et la macrosomie sont associés à une hyperglycémie. La différence de phénotype serait due au statut physiologique différent de ces deux pathologies: le faible profil Th1 observé chez les rattes GDM, associé à une grossesse réussie, serait dû au taux élevé des hormones reproductrices comme l'hCG dont l'administration diminue la production des cytokines Th1 [17]; l'augmentation des cytokines Th1 chez les nouveau-nés macrosomiques serait liée à leur "statut diabétogénique" associé à l'hyperglycémie et à l'hyperinsulinémie [18]. Nous avons effectué une étude sur des mères GDM Tunisiennes et sur leurs bébés macrosomiques et avons trouvé que les taux d'IL-10 circulants étaient élevés chez ces mères, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux. En comparant le rapport des cytokines Th1/Th2, nous notons une augmentation du phénotype Th1 chez les bébés macrosomiques. Bien que les mécanismes impliqués restent à être explorés, notre étude fut la première à montrer le changement des cellules-T en phénotype Th1 au cours de la macrosomie humaine [19].

### **Les cellules-T présentent un défaut dans la signalisation cellulaire au cours du diabète gestationnel et la macrosomie**

Au cours de l'activation des cellules-T, l'un des événements précoces déclenché suite à l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol-diphosphate et catalysé par la phospholipase C (PLC) est l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire libre,  $[Ca^{2+}]_i$ . En outre, la PLC augmente l'inositol triphosphate qui mobilise le calcium des réserves endoplasmiques et le diacylglycérol qui active la protéine kinase C. Selon le modèle capacitatif de l'entrée du calcium, on admet qu'il est d'abord libéré du réticulum endoplasmique (ER) par l'activation des récepteurs des cellules-T (TCR) et puis expulsé dans le milieu extracellulaire; en retour, ces cellules remplissent leur réserve intracellulaire en ouvrant les canaux calciques [20]. Nous avons utilisé l'ionomycine qui, à 50 nM, ouvre les canaux calciques et la thapsigargine (TG) qui recrute le  $[Ca^{2+}]_i$  des réserves du réticulum endoplasmique. Nous observons que l'ionomycine induit une augmentation plus importante du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules-T de rattes GDM et de leurs nouveau-nés obèses que chez les contrôles. Nous notons qu'avec un milieu calcique à 100% et à 0%, la TG induit une augmentation plus importante du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules-T des rattes GDM et de leurs bébés macrosomiques que des animaux témoins [21]. Ces résultats démontrent que la signalisation calcique des cellules-T est altérée au cours du diabète gestationnel et la macrosomie.

## **Les cellules-T régulatrices (T-Reg) sont surexprimées au cours du diabète gestationnel**

Il a été suggéré qu'au cours de leur développement dans le thymus, les cellules-T auto-réactives sont supprimées par un processus appelé "tolérance centrale". Cependant, cette sélection négative étant incomplète, celles qui échappent à cette suppression clonale sont supposées être contrôlées à la périphérie par les cellules-T régulatrices (T-Reg) qui suppriment l'activation et l'expansion des cellules auto-réactives évadées [22]. Ainsi, les cellules T-Reg contrôlent la délicate balance entre immunité et tolérance, ce qui explique leur important rôle lors des maladies autoimmunes, du cancer, de la tolérance à la transplantation et de l'allergie. Cependant, leur implication dans le diabète gestationnel et la macrosomie n'est pas bien connue. Il est important de mentionner que ces cellules expriment constitutivement  $CD4^+CD25^+$ , un facteur de transcription appelé Foxp3 et CTLA-4. Holm et al, [23] ont rapporté que la fréquence des cellules-T  $CD4^+CD25^+$  était significativement plus élevée chez les enfants nés de mères diabétiques de type 1 que chez ceux nés de mères normales. En outre, chez ces enfants, ces cellules présentent une mémoire plus prononcée du phénotype avec une augmentation de l'expression de CCR4 et une diminution de CD62L, suggérant une activation précoce du système immunitaire fœtal, conséquence du statut immunitaire maternel.

## **La programmation *in utero* semble être responsable des modifications observées à l'âge adulte?**

En 1995, David Barker [24] écrivait : "L'hypothèse des origines fœtales énonce que la malnutrition fœtale, en milieu ou à une période tardive de la gestation, qui aboutit à une croissance fœtale disproportionnée, programme plus tard une maladie coronarienne". Le processus, par lequel un stimulus ou une lésion à une période délicate ou critique du développement entraîne des effets à long terme, est appelé programmation. En fait, cette programmation *in utero* semble créer une sorte de "mémoire métabolique" puisque les anomalies observées dans le système physiologique pendant la période gestationnelle sont responsables, à l'âge adulte, de "l'apparition" de maladies comme le diabète de type 2 et l'obésité, associées au syndrome métabolique. Il existe, chez la mère et le fœtus âgé de 6 mois, une bonne corrélation entre les taux plasmatiques en cholestérol et, certaines altérations telles que les taux élevés de triacylglycérol (TAG), apoB100, VLDL, LDL persistent souvent



chez les nouveau-nés macrosomiques après un mois de vie [10]. Nous avons montré, chez les rats macrosomiques nés de mères GDM, que la plupart des paramètres lipidiques se normalisent vers l'âge de 2 mois et réapparaissent à l'âge adulte. Ces observations suggèrent qu'il existe une sorte de "mémoire métabolique" *in utero* qui est, en quelque sorte, dormant pendant l'enfance et qui induirait, chez ces animaux à l'âge adulte, une augmentation des taux de glucose, d'insuline et de lipides [25].

Les conséquences du diabète gestationnel ne se limitent pas au risque de malformations congénitales et de macrosomie fœtale. Il a été également démontré qu'indépendamment de leur poids à la naissance, les enfants ou jeunes adultes de mères diabétiques présentent, quel que soit le type de diabète maternel, une plus grande fréquence d'insulino-résistance et d'intolérance au glucose que les enfants nés de mères non diabétiques [26]. Ce phénomène ne peut s'expliquer entièrement par la transmission de gènes prédisposant au diabète mais il traduit un effet persistant de perturbations de la croissance et du métabolisme induites par l'environnement intra-utérin diabétique. Chez l'animal, des manipulations expérimentales des conditions de gestation ont apporté de solides arguments en faveur du rôle causal des conditions nutritionnelles intra-utérines sur la santé ultérieure [27]. Les mécanismes précis de ces relations ne sont pas bien connus mais certaines hypothèses ont été avancées: des conditions de grossesse particulières présenteraient une entrave au développement de certaines lignées cellulaires ou, au contraire, favoriseraient le développement préférentiel d'autres lignées. Il est également possible que des altérations fonctionnelles soient en cause telles que, par exemple, des modifications durables de l'expression de certains gènes. La progression dans la connaissance des mécanismes épigénétiques offrirait un cadre conceptuel pour explorer les relations entre environnement intra-utérin au début de la vie et santé à long terme.

Les modifications métaboliques *in utero*, responsables de l'apparition de ces anomalies physiologiques chez l'adulte, restent à être approfondies. Cependant, il est possible que l'hyperinsulinémie fœtale soit un facteur tératogène endogène au cours des périodes critiques de développement du fœtus, aboutissant à des changements structuraux permanents et fonctionnels des organes et une programmation conséquente de la "mémoire métabolique" [5]. La mauvaise régulation des récepteurs à l'insuline chez les fœtus hyperinsulinémiques pourrait augmenter ses sites de liaison et, ainsi, ses effets métaboliques.

Des études expérimentales réalisées sur des rattes ont montré le lien étroit entre l'environnement nutritionnel utérin au cours de la vie fœtale et le risque à développer des maladies dégénératives à l'âge adulte. Erhuma et coll., [28] ont nourri, à différentes périodes de la gestation, des rattes gestantes avec un régime contrôle et un régime carencé en protéine; les nouveau-nés ont été étudiés à différents moments de la croissance, soit à 1, 9 et 18 mois. Tous les rats âgés de 1 et 9 mois, issus de mères exposées au régime test, avaient des concentrations plasmatiques en triglycérides, cholestérol, glucose et insuline semblables à celles des contrôles; à 18 mois, il est apparu l'évidence d'une hypertriglycémie liée au faible régime protéique et une insulino-résistance. En plus, à cet âge, ils présentaient une stéatose hépatique et avaient 2 à 3 fois plus de triglycéride que les animaux contrôles. Ces changements phénotypiques étaient accompagnés par des modifications dans l'expression des ARNm et des facteurs de transcription comme SREBP-1c et ChREBP. Le rôle de la SREBP-1c (*sterol-regulatory-element-binding protein-1c*) dans la régulation du métabolisme hépatique est maintenant bien établi. En effet, l'insuline et le glucose stimulent la synthèse de la SREBP-1c qui induit, dans le foie et le tissu adipeux, l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse, surtout la synthèse des acides gras et des triacylglycérols (TAG) [29].

Les résultats obtenus par Erhuma et coll., [28] indiquent que la restriction protéique prénatale programme le développement d'un syndrome métabolique qui apparaît seulement à l'âge adulte, avec implication de l'expression altérée des médiateurs clés du phénotype programmé comme SREBP-1c et ChREBP, mais les bases du changement du statut métabolique qui survient entre 9 et 18 mois demeurent, à nos jours, non identifiées. Ces résultats sont cependant en accord avec ceux de Reusens et al, [30] qui ont observé qu'à certaines étapes critiques du développement embryonnaire, un déséquilibre nutritionnel chez la mère ou des altérations du transport placentaire des nutriments, menant à une malnutrition fœtale, pourraient déclencher, chez le fœtus, des adaptations métaboliques ainsi qu'une redistribution des ressources vers les organes nobles comme le cerveau, au détriment d'autres organes tels que les viscères. Ces adaptations et ces redistributions des ressources pourraient alors entraîner des altérations dans la croissance et les fonctions de ces organes et mener à terme au syndrome métabolique. On conçoit alors que le déficit nutritionnel global, en tant que réduction de l'apport calorique, peut perturber l'élaboration de l'individu.

Des études expérimentales ont mis en évidence le rôle clé de l'hypothalamus fœtal qui peut être "programmé" par des changements transitoires de l'état endocrine prénatal. Nous pouvons citer les travaux de Yura et coll., [31] qui ont montré que la malnutrition *in utero* est étroitement associée à l'obésité à l'âge adulte. Ils ont aussi démontré que la leptine précoce modifiait, chez des souris sous-alimentées, la régulation énergétique par l'hypothalamus et contribuait au "développement des origines de l'obésité". Toutefois, l'implication d'autres facteurs dans les modifications *in utero* reste à être explorée dans le futur (Figure 1). Il a été également démontré que les perturbations observées chez les bébés issus de rattes rendues diabétiques sont accompagnées par, et souvent corrélées avec, des malformations périnatales acquises des noyaux hypothalamiques ventromédians (VMN) et particulièrement des altérations des neurones hypothalamiques exprimant des neuropeptides orexigéniques comme le neuropeptide Y (NPY) dans le noyau hypothalamique arqué (ARC) [32]. Ces perturbations hypothalamiques peuvent être co-responsables d'altérations tardives de la prise alimentaire, du poids corporel et du métabolisme glucidique chez les nouveau-nés issus de mères diabétiques non traitées. Franke et coll., [33] ont montré, chez des rattes, que le diabète gestationnel non traité entraîne de graves conséquences pour la différenciation des neurones hypothalamiques du nouveau-né. Ces altérations neuropeptidergiques hypothalamiques sont évitables par la normalisation de l'hyperglycémie gestationnelle. L'augmentation du neuropeptide Y chez les nouveau-nés issus de rattes hyperglycémiques s'explique par une "mauvaise programmation" du système neuropeptidergique due à une exposition au diabète gestationnel non traité. Ces altérations acquises observées chez les bébés pourraient fortement contribuer à augmenter le risque à développer l'hyperphagie, le surpoids et des perturbations diabétogéniques à l'âge adulte. L'organisation altérée des systèmes de régulation neuropeptidergiques peut, en terme de prédisposition, aboutir à un dysfonctionnement ultérieur ou, plus tard, à une altération des neurones hypothalamiques à travers une glucotoxicité et une insulino-résistance hypothalamique progressive.

## **Conclusion**

La macrosomie fœtale est un facteur de risque pour l'obésité ultérieure, le diabète et la dyslipoprotéinémie. La macrosomie est une pathologie où le développement *in utero*, dans un contexte d'hyperglycémie et d'hyperlipidémie, joue un rôle important dans la programmation de la "mémoire métabolique". Les causes primaires de l'insulino-résistance au cours du diabète de type 2 et du syndrome métabolique devraient être recherchées en dehors des

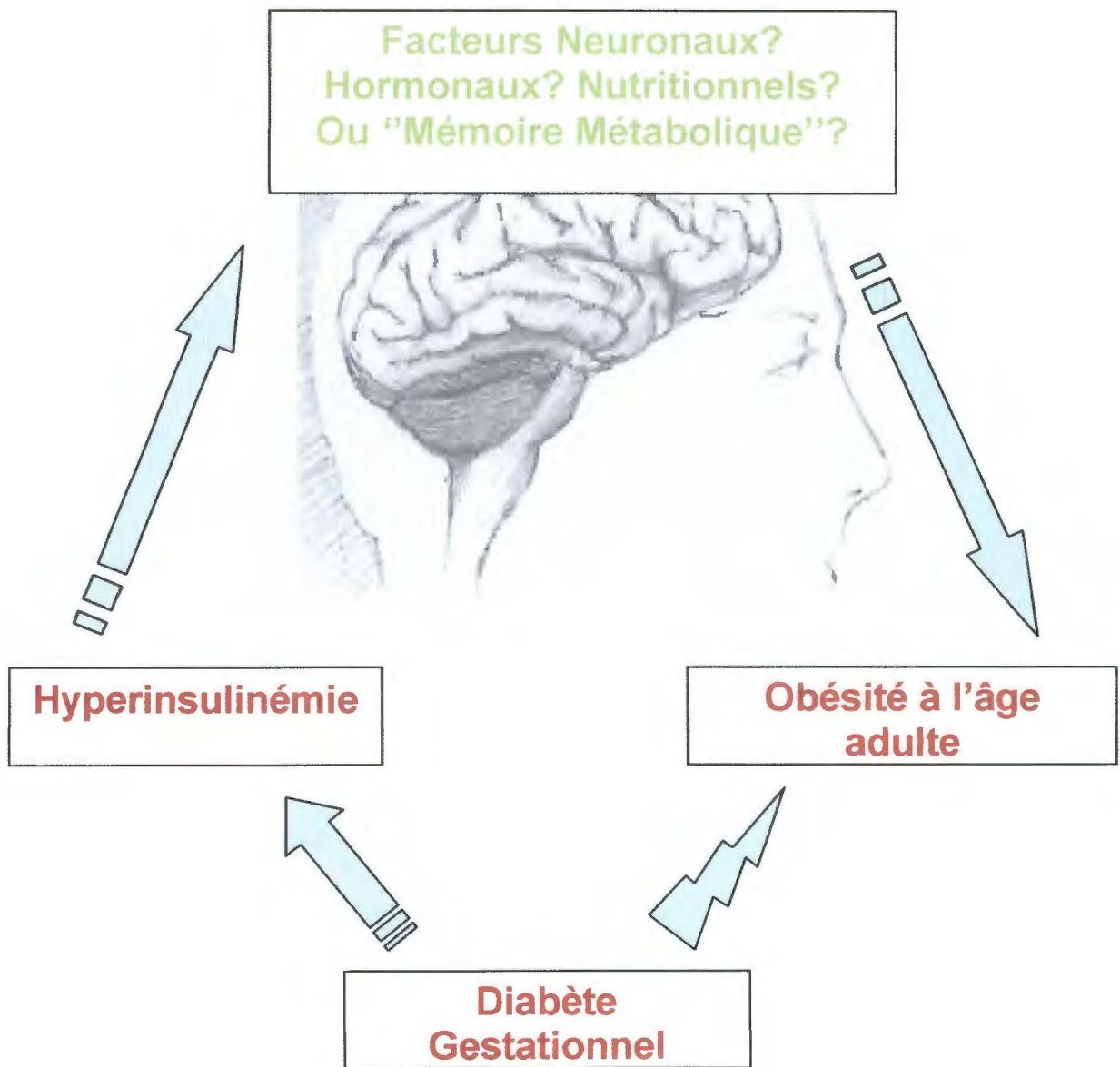
cellules  $\beta$  pancréatiques, dans le réseau complexe de neurones, d'hormones et de signaux métaboliques qui orchestrent le métabolisme des tissus. La macrosomie est une pathologie multifactorielle, impliquant les anomalies des lipides, des lipoprotéines, du statut antioxydant, et l'activation du système immunitaire (prédisposition au phénotype Th1) (Figure 2). Le phénotype des cellules-T régulatrices (T-Reg) est surexprimé chez les mères GDM et leurs enfants macrosomiques. Cependant, il reste à déterminer comment la série des modulateurs métaboliques tels que l'insuline et les lipides influencerait l'activation des cellules-T au cours de ces pathologies.

## Références bibliographiques

1. Nassar AH, Usta IM, Khalil AM, *et al.* Fetal macrosomia ( $>$  or  $=4500$  g): perinatal outcome of 231 cases according to the mode of delivery. *J Perinatol* 2003; 23: 136-41.
2. Van Assche FA, Holemans K, Aerts L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br Med Bull*. 2001; 60: 173-82.
3. Jimenez-Moleon JJ, Bueno-Cavanillas A, Luna-del-Castillo Jde D. Impact of different levels of carbohydrate intolerance on neonatal outcomes classically associated with gestational diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002; 102: 36-41.
4. Palinski W, Napoli G. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *The FASEB Journal* 2002; 16: 1348-60.
5. Dorner G, Plagemann A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res* 1994; 26: 213-21.
6. Merzouk H, Madani S, Korso N, *et al.* Maternal and fetal serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions in type 1 diabetic pregnancy: relationship with maternal glycemic control. *J Lab Clin Med* 2000; 136: 441-8.
7. Vercheval M, De Hertogh R, Pampfer S, *et al.* Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period. *Diabetologia*. 1990; 33(4): 187-91.
8. Buggage RR, Matteson DM, Shen DF, Sun B, Tuailon N, Chan CC. Effect of sex hormones on experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Immunol Invest*. 2003; 32(4): 259-73.
9. Bioletto S, Golay A, Munger R, Kalix B, James RW. Acute hyperinsulinemia and very-low-density and low-density lipoprotein subfractions in obese subjects. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 443-49.

10. Merzouk H, Madani S, Hichami A, *et al.* Age-related changes in fatty acids in obese offspring of streptozotocin-induced diabetic rats. *Obes Res* 2002; 10: 703-14.
11. Giordano C. Immunobiology of normal and diabetic pregnancy. *Immunol Today* 1990; 11: 301-3.
12. Roll U, Scheeser J, Standl E, Ziegler AG. Alterations of lymphocytes subsets in children of diabetic mothers. *Diabetologia* 1994; 37: 1132-41.
13. Lapolla A, Sanzari MC, Zancanaro F, *et al.* A study on lymphocyte subpopulation in diabetic mothers at delivery and in their newborn. *Diabetes Nutr Metab* 1999; 12: 394-9.
14. Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A. N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. *J Autoimmun* 2006; 26: 268-77.
15. Raghupathy R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin Immunol*. 2001; 13(4): 219-27.
16. Reinhard G, Noll A, Schlebusch H, Mallmann P, Ruecker AV. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245(3): 933-8.
17. Khan NA, Khan A, Savelkoul HF, Benner R. Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor. *Hum Immunol*. 2001; 62(12): 1315-23.
18. Soulimane-Mokhtari NA, Guermouche B, Yessoufou A, *et al.* Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(3): 287-95.
19. Atégbo JM, Grissa O, Yessoufou A, *et al.* Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(10): 4137-43.
20. Putney JW. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium*. 1997; 21(3): 257-61.
21. Guermouche B, Yessoufou A, Soulimane N, *et al.* n-3 fatty acids modulate T-cell calcium signaling in obese macrosomic rats. *Obes Res* 2004; 12: 1744-53.
22. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4(4): 330-6.
23. Holm BC, Svensson J, Akesson C, *et al.* Evidence for immunological priming and increased frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cord blood T cells in children born to mothers with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146(3): 493-502.
24. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995; 311: 171-4.
25. Merzouk S, Hichami A, Madani S, *et al.* Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22: 15-27.

26. Sobngwi E, Boudou P, Mauvais-Jarvis F, *et al.* Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. *Lancet*. 2003; 361(9372): 1861-5.
27. Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* 2005; 565(Pt 1): 3-8.
28. Erhuma A, Salter AM, Sculley DV, Langley-Evans SC, Bennett AJ. Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292(6): E1702-14.
29. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 103-13.
30. Reusens B, Remacle C. [Development of diabetes, experimental models]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*. 2005; *Médecine\_Sciences Flammarion*, 77-84.
31. Yura S, Itoh H, Sagawa N, *et al.* Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 2005; 1: 371-8.
32. Plagemann A, Harder T, Melchior K, Rake A, Rohde W, Dörner G. Elevation of hypothalamic neuropeptide Y-neurons in adult offspring of diabetic mother rats. *Neuroreport*. 1999; 10(15): 3211-6.
33. Franke K, Harder T, Aerts L, *et al.* 'Programming' of orexigenic and anorexigenic hypothalamic neurons in offspring of treated and untreated diabetic mother rats. *Brain Res*. 2005; 1031(2): 276-83.



**Figure 1:** Obésité à l'âge adulte et implication des facteurs neuronaux, hormonaux, nutritionnels ou de la "mémoire métabolique"



**Diabète Gestationnel**  
(Poids > 4,000kg)



**Bébé en surpoids**  
(IMC > 25kg/m<sup>2</sup>)

**Complications**  
Hyperglycémie,  
Hyperinsulinémie,  
Hyperlipidémie



**Complications**  
Hypoglycémie,  
Hyperinsulinémie  
Dystocie des épaules,  
Troubles Respiratoires, etc.

**“Mémoire Métabolique”**  
*In utero*



**Impact sur l'enfant**

Macrosomie, Obésité, Altération des  
Lipides et  
des Lipoprotéines, Statut Anti-Oxydant  
Réduit,  
Activation du Système Immunitaire → Th1

**Figure 2:** Modifications métaboliques et immunologiques chez le macrosome au cours du diabète gestationnel et Impact sur l'enfant



## Légendes des figures

### **Figure 1: Modifications métaboliques et immunologiques chez le macrosome au cours du diabète gestationnel**

Le diabète gestationnel est une pathologie de gravité variable ; il entraîne aussi bien chez la mère que chez le nouveau-né macrosome des complications diverses. Chez l'enfant, on assiste à l'âge adulte à une obésité, à des altérations des lipoprotéines et des lipides, du statut anti-oxydant et à une activation du système immunitaire.

### **Figure 2 : Obésité à l'âge adulte et implication des facteurs neuronaux, hormonaux, nutritionnels ou de la 'mémoire métabolique'**

Le diabète gestationnel induit chez le nouveau-né macrosomique une hyperinsulinémie et l'obésité à l'âge adulte. Les mécanismes impliqués dans ce processus pourraient être neuronaux, hormonaux, nutritionnels ou simplement dus à une programmation *in utero*.

## **Modifications physiologiques et immunologiques au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie : implication de la programmation *in utero*? (Soumis)**

**Jean-Marc Atègbo<sup>1</sup>, Akadiri Yessoufou<sup>1</sup>, Kabirou Moutairou<sup>1</sup>, Karim L. Dramane<sup>1</sup>, Naim Akhtar Khan<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin;

<sup>2</sup>Université de Bourgogne, UPRES EA 4183 "Lipides et Signalisation Cellulaire", Faculté des Sciences de la Vie, 6, Boulevard Gabriel, Dijon 21000, France

### **Résumé :**

Des études épidémiologiques chez l'homme ont montré un lien entre le faible poids à la naissance et le risque accru de développer des maladies dégénératives à l'âge adulte. Suite à ces études, Barker *et al.* (1) ont émis en 1989 l'hypothèse de «*l'origine foetale des maladies chroniques dégénératives de l'adulte*». Le diabète gestationnel aboutit fréquemment à la macrosomie et à l'obésité infantile. Il semble que les anomalies du métabolisme des carbohydrates et des lipides, observées chez les nouveau-nés en surpoids issus de mères ayant souffert du diabète gestationnel, sont dues à l'hyperglycémie maternelle qui aboutit à l'hyperinsulinémie foetale. Nous avons développé un modèle animal de macrosomie et avons évalué l'apparition de l'obésité chez ces animaux. Les bébés macrosomiques, nés de mères diabétiques, sont prédisposés à développer, à l'âge adulte, l'intolérance au glucose et l'obésité. Il semble que la programmation *in utero* au cours du diabète gestationnel crée une "mémoire métabolique" qui serait responsable du développement de l'obésité chez les nouveau-nés macrosomiques. Nous avons démontré que le métabolisme des lipides, le statut anti-oxydant et le système immunitaire altérés sont impliqués dans l'étiopathologie de l'obésité chez ces animaux.

**Mots-clés :** Macrosomie, diabète gestationnel, lipides, acides gras, mémoire métabolique

*Publication n°4*

**Peroxisome Proliferator-Activated Receptor – $\alpha$  gene modulates pancreatic transcriptional factors and inflammation in adiposes tissues in normal and hyperglycaemic mice**

Akadiri Yessoufou\*, **Jean-Marc Atègbo\***, Eugène Attakpa, Aziz Hichami, Kabirou Moutairou, Karim L. Dramane, Naim Akhtar Khan

**(Soumis)**

*Objectif de l'étude*

Nous évaluons l'implication de l'absence de PPAR- $\alpha$  dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et l'inflammation des adipocytes chez les souris adultes C57BL/6J nées de mères normales (WT) et de mères PPAR $\alpha$ -null diabétiques

**Title:**

**Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  gene modulates pancreatic transcriptional factors and inflammation in adipose tissues in normal and hyperglycaemic mice**

**Abbreviated title:** PPAR $\alpha$  modulate transcription and inflammation

**Authors:**

Akadiri Yessoufou\*,<sup>1,3</sup> Jean-Marc Atègbo\*,<sup>2,3</sup> Eugène Attakpa,<sup>2,3</sup> Aziz Hichami,<sup>3</sup> Kabirou Moutairou,<sup>1</sup> Karim L. Dramane,<sup>2</sup> Naim Akhtar Khan<sup>3</sup>

**Authors' affiliations:**

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA), <sup>2</sup>Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin.

<sup>3</sup>UPRES EA 4183 Lipides et Signalisation Cellulaire, Faculté des Sciences de la Vie, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21 000 Dijon, France.

**Key words:** Insulin resistance; insulin mRNA; PPAR $\alpha$ ; inflammation; hyperglycaemia

**Corresponding author:** N.A. Khan, Department of Physiology, UPRES EA 4183 Lipides et Signalisation Cellulaire, Université de Bourgogne, Faculté des Sciences de la Vie, 6 Bd Gabriel, 21000, Dijon, France; Tel. + 33 3 80 39 63 12; Fax. + 33 3 80 39 63 30; E-mail: [Naim.Khan@u-bourgogne.fr](mailto:Naim.Khan@u-bourgogne.fr)

\*Both the authors (AK and JMA) equally participated in this study.

**Disclosure statement:** All of the authors have nothing to declare as far as the conflict of interest is concerned.

## Abstract

We assessed the implication of PPAR $\alpha$  deficiency in the modulation of insulin gene transcription and adipocyte inflammation in C57BL/6J adult mice born of wild type (WT) and PPAR $\alpha$ -null diabetic dams. On fasting, the adult offspring of WT-diabetic and PPAR $\alpha$ -null-diabetic dams were hyperglycaemic though the control PPAR $\alpha$ -null mice were hypoglycaemic. Serum insulin and its pancreatic mRNA transcripts were upregulated in WT-hyperglycaemic, though PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice exhibited their downregulated levels, suggesting that PPAR $\alpha$  gene deletion contributes to low insulin gene transcription. In both normal and hyperglycaemic conditions, the deletion of PPAR $\alpha$  gene resulted in the downregulation of mRNAs of insulin gene transcriptional factors like Pdx-1, Nkx6.1 and MafA, though hyperglycaemia upregulated Nkx6.1 and MafA mRNA transcripts in WT mice. Besides, the pancreatic functional capacity was also diminished by PPAR $\alpha$  gene deletion as the pancreas of PPAR $\alpha$ -null mice expressed low Glut2 and glucokinase mRNA. PPAR $\alpha$ -null mice also expressed high adiponectin and leptin mRNA levels compared to WT animals, and these adipokines were downregulated in hyperglycaemic conditions in both WT and PPAR $\alpha$ -null mice. In adipose tissues, PPAR $\alpha$ -null mice exhibited upregulation of CD14 and CD68 mRNA, generally expressed by macrophages. Hyperglycaemia upregulated these mRNA in WT, but not in PPAR $\alpha$ -null, mice. Deletion of PPAR $\alpha$  gene downregulated the adipocyte mRNA of MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 and RANTES, though pro-inflammatory TLR-2 and TLR-4 mRNA were upregulated in the adipose tissues. Altogether, our results suggest that PPAR $\alpha$  deficiency in mice is implicated in the modulation of insulin gene transcription and inflammatory status in adipose tissues in normal and hyperglycaemic conditions.

### Abbreviations:

GK : glucokinase; Nkx6.1 : NK6 transcription factor related-locus-1; Pdx-1 : pancreatic and duodenal homeobox-1; PPAR $\alpha$  : peroxisome proliferator-activated receptor-alpha; MCP-1 : monocyte-chemoattractant protein-1; RANTES: regulated on activation of normal T cell expressed and secreted; SREBP1c : Sterol response element-binding protein 1c; TG : triglyceride; TLR : Toll-like receptor; FFA : free fatty acids; WAT : white adipose tissue; PBS : Phosphate Buffered Saline; WT : Wild type.

## Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) play key roles as lipid/nutritional state sensors and transcriptional regulators of lipid metabolism (1, 2). So far, three isotypes of PPARs have been well-identified in lower vertebrates and mammals (2). PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  ( $\delta$ ) and PPAR $\gamma$  exhibit different tissue distribution as well as different ligand specificities and functions (3). PPAR $\alpha$  is principally expressed in organs with a high capacity for fatty acid oxidation, *e.g.*, heart, skeletal muscle, liver and kidney (2). PPAR $\alpha$  is activated by fatty acids and lipid-lowering fibrates which are used clinically for the treatment of hypertriglyceridaemia (4). PPAR $\alpha$  regulates the expression of genes that are involved in lipid metabolism and glucose homeostasis, thereby improving markers for atherosclerosis and insulin resistance (2).

Hyperglycemia, related to insulin resistance, is due to a decrease in peripheral glucose uptake and to an increase in hepatic glucose production (5). It has been generally accepted that glucose stimulates both insulin release, and the transcription of insulin gene and translation of the nascent mRNA in pancreatic  $\beta$ -cells (6, 7). Glucose also enhances the stability of insulin mRNA in rodent  $\beta$ -cells through a mechanism involving the binding of polypyrimidine tract-binding protein to the 3' untranslated region of the insulin mRNA (8).

In order to induce insulin resistance, most of the investigators have adopted a strategy in which they feed the rodents with the high-fat (HF) diets (9, 10). However, this dietary intervention is not well-standardized, and the HF-induced phenotype varies distinctly among different studies. Recently, we have developed a model of insulin resistance in mice which were born of the dams, rendered diabetic by the administration of streptozotocin (11). The pups and their diabetic mothers were fed the standard laboratory chow. These offspring, with a normal phenotype, developed marked hyperinsulinemia and hyperglycaemia at adulthood (11). We have also conducted a study on the offspring, born of the PPAR $\alpha$ -null diabetic dams, and we have observed that these pups, in fasted conditions, were hyperglycaemic and hypoinsulinemic compared to PPAR $\alpha$ -null mice, born of non-diabetic mothers (11). We would like to recall that the pups born of control PPAR $\alpha$ -null dams presented their well-described characteristics in the fed state; however, during fasting conditions, they developed severe hypoglycaemia in association with elevated plasma free fatty acids (FFAs), hepatic and cardiac steatosis, and hypoketonemia, consistent with a failure of fasting to induce fatty acid catabolism by  $\beta$ -oxidation and ketogenesis (12, 13).

Because PPAR $\alpha$  plays a key role in the regulation of insulin resistance and inflammation, we have conducted the present study. We have examined the expression of mRNA encoding for insulin gene. We also assessed the  $\beta$ -cell function and survival by determining the levels of Glut2 and glucokinase mRNA.

For  $\beta$ -cell functions, some transcriptional factors like pancreatic and duodenal homeobox (Pdx)-1, NK6 transcription factor related-locus-1 (Nkx6.1) and MafA are required. Pdx-1 transcriptionally regulates insulin, glucokinase and islet amyloid polypeptide (14, 15). Nkx6.1 is important for the terminal differentiation of  $\beta$ -cells (14) and is known to affect glucose-induced insulin secretion (16). It is noteworthy that (Pdx)-1 and MafA can exert their positive actions separately on the promoter and their effects are additive (17). Hence, we determined the pancreatic mRNA of these transcription factors in order to respond the question whether these factors are involved in the  $\beta$ -cell adaptation in response to deletion of PPAR $\alpha$  gene and insulin resistance.

Because adipokines, secreted by adipose tissues, play crucial role in the onset of type II diabetes and obesity (18), we determined the mRNA encoding for leptin and adiponectin in adipose tissues. Interestingly, macrophages have been shown to infiltrate several organs, including adipose tissues, during inflammatory processes (19). We, therefore, detected the expression of mRNA of CD14, CD68 and F4/80 in the adipose tissues of these animals. CD14 has been shown to bind to lipopolysaccharide (LPS) and to interact with Toll-like receptor (TLR)-4 (20), and this spurred us to examine the expression of TLR-2 and TLR-4 mRNA in adipocytes. The inflammatory agents like MCP-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  are also known to be secreted by adipocytes (21). It was, therefore, thought worthwhile to assess the mRNA expression of these agents alongwith that of IL-1 $\beta$  and TCR $\alpha$  and, regulated on activation of normal T cell expressed and secreted (RANTES) and its receptor CCR5 in adipose tissues.

All the afore-mentioned parameters were studied in adult control mice and hyperglycaemic animals which were the descendents of diabetic PPAR $\alpha$ -null and control dams.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

The study was performed on wild type (WT) mice (Charles River, Les Oncins, France) and homozygous PPAR $\alpha$ -null (PPAR $\alpha$ -knockout) mice of C57BL/6J genetic background (22) (The Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA). Mice were housed individually in wood chip-bedded plastic cages at constant temperature (25°C) and humidity (60  $\pm$  5%) with a 12-h light-dark cycle. The offspring of diabetic dams, rendered diabetic by five consecutive daily ip injections of streptozotocin (40 mg/kg body weight), were obtained as described elsewhere (11). To follow the hyperglycaemia, blood was collected by cutting off the tip of tail and squeezing it gently. Glycemia was measured by One Touch ULTRA Glucometer (LifeScan, Johnson & Johnson, Piscataway, NJ, USA). Only the male offspring were included in the study. All experiments were performed at 3 months of age in offspring.

The general guidelines for the care and use of laboratory animals, recommended by the council of European Economic Communities, were followed. The experimental protocol was approved by the Regional Ethical Committee.

### **Blood, liver, pancreas and adipose tissue samples**

After overnight fasting, 15 male offspring at age of 3 months, in each group, were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg body weight). The abdominal cavity was opened, and whole blood was drawn from the abdominal aorta. Serum was obtained by low-speed centrifugation (1000 g x 20 min) and immediately stored at -80° C for glucose, insulin, lipid, and cytokine determinations. The liver and the pancreas were removed and immediately frozen in liquid nitrogen and used, respectively, for total RNA extraction and lipid determinations. The epididymal white adipose tissues in male offspring were removed, washed with cold saline, weighed and frozen in liquid nitrogen.

### **Glucose and insulin determination**

The determination of insulin was performed in samples that were stored at -80°C. Serum insulin was determined using an ELISA kit (LINCO Research Inc, St. Charles, MO, USA), according to the manufacturer's instructions. Serum glucose was determined by the glucose oxidase method using a glucose analyser (Beckman Instruments, USA).



### **Lipid determination**

Serum triglyceride (TG) content was measured using enzymatic methods. After liver lipid extraction according to the method of Folch et al. (23), liver TG content was measured by using a commercially available kit (Boehringer, France).

### **Determination of serum and liver free fatty acids**

Serum and liver total lipids, extracted according to the method of Folch et al. (23), were transmethylated and fatty acids were analysed by GLC (24), using a Becker gas chromatography (Becker Instruments) equipped with a 50 m capillary glass column packed with carbowax 20 m (Spiral-RD, France). C<sub>17:0</sub> methyl ester was used as an internal standard. Identification of different fatty acids was performed by comparison of relative retention times with those of commercial standards. Areas were calculated with an ENICA 21 integrator (DELSI Instrument).

### **Real-time RT-PCR quantification assay**

Total RNA was prepared from the liver, the pancreas and the adipose tissue using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Groningen, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The integrity of RNA was electrophoretically checked by ethidium bromide staining and by the OD absorption ratio OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> more than 1.9. One microgram of total RNA was reverse transcribed with Superscript II RNase H-reverse transcriptase using oligo (dT) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies, France).

Real-time PCR was performed on an iCycler iQ real-time detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and amplification was done by using SYBR Green I detection (SYBR Green JumpStart, Taq ReadyMix for Quantitative PCR, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Oligonucleotide primers, used for mRNA analysis, were based on the sequences of mice gene in the GeneBank database. All mice RT-PCR primer sets used to amplify the genes in these studies are presented in Table 1. Forward and reverse primers used to amplify  $\beta$ -actin message in mouse islets were 5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' and 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'.

The amplification was carried out in a total volume of 25  $\mu$ l containing 12.5  $\mu$ l SYBR Green Taq Ready Mix, 0.3  $\mu$ M of each primer and diluted cDNA. Cycling conditions consisted of an initial denaturation step of 95°C for 5 min as a hot start followed by 40 cycles of 95 °C for 30 sec or at 60°C for 30 sec with a single fluorescence detection point at the end

of the relevant annealing or extension segment. At the end of the PCR, the temperature was increased from 60 to 95°C at a rate of 2°C/min, and the fluorescence was measured every 15 sec to draw the melting curve. The standard curves were generated for each protein or  $\beta$ -actin using serial dilutions of positive control template in order to establish PCR efficiencies. All determinations were performed, at least, in duplicates using two dilutions of each assay to achieve reproducibility.

Results were evaluated by iCycler iQ software including standard curves, amplification efficiency (E) and threshold cycle (Ct). Relative quantitation of mRNA expression of a large number of signalling factors in different groups was determined using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method (25, 26), in which  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$  of gene of interest -  $\Delta\text{Ct}$  of  $\beta$  actin.  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$  of interest group - Ct of control group. Relative quantity (RQ) was calculated as follows:  $\text{RQ} = (1 + E)^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ .

### **Statistical analysis**

Results are shown as means  $\pm$  SEM. The significance of the differences between mean values was determined by two-way ANOVA (STATISTICA, Version 4.1, Statsoft, Paris, France), followed by the least significant difference (LSD) test. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### **Serum glucose concentration and body weight**

PPAR $\alpha$ -null mice were hypoglycaemic compared to wild type (WT) animals. Serum glucose concentration was significantly high in PPAR $\alpha$ -null and WT-hyperglycaemic mice in comparison with their corresponding controls. PPAR $\alpha$ -null control mice had significantly higher body weight than WT controls, but no difference was observed between WT control and WT-hyperglycaemic mice (Fig. 1).

### **Serum insulin concentration and insulin mRNA expression in the pancreas**

Compared with WT control animals, insulin levels were significantly increased in WT-hyperglycaemic mice (Fig. 2). However, insulin concentrations were decreased in PPAR $\alpha$ -null mice as compared to WT animals. Hyperglycaemic in PPAR $\alpha$ -null mice had low insulin concentrations compared to PPAR $\alpha$ -null control mice (Fig. 2).

The expression of insulin mRNA in the pancreas was up-regulated in WT-hyperglycaemic mice and down-regulated in PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice compared with their corresponding controls (Fig. 2). However, PPAR $\alpha$ -null mice had lower expression of insulin mRNA than WT animals.

### **Pdx-1, MafA, Nkx6-1 and C/EBP- $\beta$ mRNA expression in the pancreas**

In order to gain insight into  $\beta$ -cell functional aspects, we performed quantitative analysis of  $\beta$ -cell transcription factors. We noticed that the pancreas of PPAR $\alpha$ -null mice expressed lower levels of mRNA of Pdx-1, MafA and Nkx6-1 than WT animals (Fig. 3). The hyperglycaemic-WT animals, but not PPAR $\alpha$ -null mice, expressed higher MafA and Nkx6-1, but not Pdx-1, transcripts than their corresponding controls (Fig. 3). However, C/EBP- $\beta$  mRNA was slightly expressed in pancreas of both WT and PPAR- $\alpha$  null control animals without any differences in hyperglycaemic conditions.

### **Glut 2, glucokinase and mRNA expression in the pancreas**

We also investigated the expression of glucokinase (GK) and Glut2 mRNA as they are implicated in the transcriptional regulation in  $\beta$ -cells by Pdx-1 (27). The expression of Glut2 and GK mRNA was downregulated in PPAR $\alpha$ -null mice in comparison with wild type animals (Fig. 4). Hyperglycaemia further diminished Glut2 mRNA levels in WT and PPAR $\alpha$ -null mice as compared to their respective controls (Fig. 4). However, the GK mRNA

expression was decreased in WT-hyperglycaemic animals and was not altered in PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice as compared to their corresponding control animals (Fig. 4).

### **Plasma and hepatic Triglyceride (TG) and free fatty acids (FFA) concentrations**

Hepatic TG and FFA were higher in PPAR $\alpha$ -null mice as compared to WT animals (Fig. 5). WT- and PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice had a high accumulation of TG and FFA in plasma and liver compared with their respective controls (Fig. 5). However, plasmatic FFA were not significantly different in WT and PPAR $\alpha$ -null mice, though plasmatic TG levels were lower in the latter as compared to the former (Fig. 5).

### **FAT/CD36 and SREBP-1c mRNA expression in the liver**

The hepatic expression of FAT/CD36 was up-regulated in WT- and down-regulated in PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice compared with their corresponding controls (Fig. 6). The PPAR $\alpha$ -null mice had higher FAT/CD36 mRNA expression than WT animals. SREBP-1c mRNA expression was down-regulated in WT-hyperglycaemic and upregulated in PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice in comparison with their corresponding control animals (Fig. 6).

### **Adipose tissue weight and adiponectin and leptin mRNA expression**

Compared with both hyperglycaemic mice groups, control WT and PPAR $\alpha$ -null mice had high relative adipose tissue weight (Fig. 7). PPAR $\alpha$ -null control mice had significantly more adipose tissues than WT mice. The expression of adiponectin and leptin mRNA in adipose tissues was upregulated in PPAR $\alpha$ -null mice as compared to WT animals (Fig. 7). Hyperglycaemia induced low expression of these two adipokines in WT and PPAR $\alpha$ -null mice as compared to their respective controls (Fig. 7).

### **CD14, CD68, F4/80, IL1- $\beta$ and TCR $\alpha$ mRNA expression in the adipose tissue**

The expression of CD14 and CD68 mRNA in adipose tissues was upregulated in PPAR $\alpha$ -null mice as compared to wild type animals (Fig. 8). Hyperglycaemia significantly upregulated the expression of CD14 and CD68 mRNA in WT, but not in PPAR $\alpha$ -null mice. On the other hand, the expression of IL1- $\beta$  and F4/80 mRNA was decreased in PPAR $\alpha$ -null mice as compared to WT animals (Fig. 8). Furthermore, WT- and PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice had lower expression of IL1- $\beta$  and F4/80 mRNA than that in respective controls (Fig. 8). However, expression TCR $\alpha$  mRNA was not evident in wild type and hyperglycaemic mice (Fig. 8).

### **MCP-1, RANTES and CCR5 mRNA expression in the adipose tissue**

The expression of MCP-1 and RANTES mRNA was lower in PPAR $\alpha$ -null mice than that in WT animals (Fig. 9). The WT- and PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice had low mRNA expression of these two agents as compared to their respective controls. Interestingly, CCR5 mRNA expression was not apparent in adipose tissues of these animals.

### **TNF- $\alpha$ and IL-6 mRNA expression in the liver and the adipose tissue**

We did not observe any significant differences in the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA in the liver of these animals whether they were hyperglycaemic or controls. However, the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA was downregulated in the adipose tissues of PPAR $\alpha$ -null mice as compared to WT animals. Hyperglycaemia induces an increase in IL-6 mRNA and a decrease in TNF- $\alpha$  mRNA in WT animals as compared to the WT mice (Fig. 10). However, the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA was not altered by hyperglycaemia in PPAR $\alpha$ -null mice as compared to their respective controls.

### **TLR-2 and TLR-4 mRNA expression in the adipose tissue**

The PPAR $\alpha$ -null mice had higher expression of TLR-2 and TLR-4 mRNA than WT animals (Fig. 11). TLR-2 mRNA remained unchanged in WT-hyperglycaemic animals though it was diminished in PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice compared to their controls. However, TLR-4 mRNA expression was downregulated in both WT- and PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice as compared to their respective controls (Fig. 11).

## Discussion

In order to shed light on the implication of PPAR $\alpha$  in the modulation of insulin gene transcription and adipocyte inflammation in hyperglycaemic and normal conditions, we conducted the present study on the offspring, born of the WT- and PPAR $\alpha$ -null-diabetic dams. In fasted conditions, the adult offspring of WT-diabetic dams were hyperglycaemic and hyperinsulinemic, whereas those born of PPAR $\alpha$ -null-diabetic animals were hyperglycaemic and hypoinsulinemic (11), and in this article, we will term these offspring as WT-hyperglycaemic and PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic, respectively.

The first and foremost question is how PPAR $\alpha$ , in fasted and hyperglycaemic conditions, modulates  $\beta$ -cell functions. In our study, we observed that PPAR $\alpha$ -null mice developed hypoglycaemia which might be because of impaired fatty acid oxidation and increased reliance on glucose as an energy source (12). Furthermore, the PPAR $\alpha$ -null mice exhibited low insulin concentrations and mRNA transcripts as compared to WT mice. The PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice had lower serum insulin levels and pancreatic insulin mRNA transcripts than PPAR $\alpha$ -null control mice. These observations corroborate the study of Bihan et al. (28) in which these investigators reported that PPAR $\alpha$  is needed to ensure correct insulin secretory response and for the induction of insulin mRNA, which is part of the  $\beta$ -cell response to hyperglycemia.

Pancreatic  $\beta$ -cells produce and store insulin in response to physiological demand, and hyperglycaemia, within 15 min, results in the activation of a complex network of intracellular signalling pathways that trigger insulin release (29). The positive regulators are Pdx-1 and MafA which bind to the insulin promoter to provide a synergistic effect on insulin gene transcription (30). Nkx6.1 also affects glucose-induced insulin secretion (16). The hyperinsulinemic state of WT-hyperglycaemic mice may be due to high expression of MafA and Nkx6.1 mRNA. Conversely, hypoinsulinemic state in control- and hyperglycaemic-PPAR $\alpha$ -null mice might be due to diminished expression of Pdx-1, MafA and Nkx6.1 in their pancreas. Indeed, it has been shown that deletion of Pdx-1 gene in the pancreas results in abnormally low insulin concentrations (27). In our study, the action of PPAR $\alpha$  deletion on hyperinsulinemia does not seem to be mediated by C/EBP- $\beta$  as the expression of this repressor was not significantly altered in none of the groups. However, it is still not clear how PPAR $\alpha$  is responsible for the inhibition of the expression of Pdx-1, MafA and Nkx6.1 mRNA. Whether this phenomenon is directly controlled by PPAR $\alpha$  or the lipotoxicity, caused

by PPAR $\alpha$ -deficiency is responsible for these observations. The hyperglycaemia in PPAR $\alpha$ -null mice, born of PPAR $\alpha$ -null-diabetic dams, might be due to very low levels of pancreatic transcriptional factors which might contribute to very low insulin gene transcription and thereby to insulin secretion. Indeed, PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice had lower expression of Pdx-1 than PPAR $\alpha$ -null control mice.

Pancreatic  $\beta$ -cell function is associated to glucokinase (GK) activity. We observed that, in PPAR $\alpha$ -null mice, there was low GK mRNA as compared to WT animals. Hence, the diminished GK mRNA in PPAR $\alpha$ -null mice may further contribute to reduced insulin  $\beta$ -cell function, thereby to reduced insulin secretion (31). The abrupt decline in Glut2 mRNA in hyperglycaemic (both WT and PPAR $\alpha$ -null) mice may contribute to high glucose concentration in these animals as suggested by Ahlgren et al. (27) that low Glut2 levels lead to hyperglycaemia. Our results suggest that PPAR $\alpha$  may be implicated in the control of Glut2 or GK mRNA expression in the pancreas. Indeed, PPAR $\alpha$  has been considered as one of the transcription factors involved in the upregulation of Glut2 or GK mRNA (32). Yoshikawa et al. (33) have also shown that in long-term cultures of pancreatic cells with palmitate were associated to reduced expression of PPAR $\alpha$  mRNA and consequently to low expression of Glut2, GK, or preproinsulin mRNA probably through the inhibition of Pdx-1 mRNA.

In the liver, we observed that PPAR $\alpha$ -null mice abundantly accumulated not only free fatty acids but also TG. Our observations corroborate the findings of several investigators (34, 35) who have shown that PPAR $\alpha$ -null mice accumulate increased hepatic TG in response to feeding and during fasting. Djouadi et al. (36) have reported that PPAR $\alpha$ -null mice develop massive accumulations of myocardial lipids under conditions that increase fatty acid flux. Campbell et al. (37) have explained this phenomenon by demonstrating that there is a marked increase in malonyl-CoA, a potent inhibitor of fatty acid oxidation, in the hearts of PPAR $\alpha$ -null mice. We would like to recall that PPAR $\alpha$  agonists lower TG levels by increasing lipoprotein lipase gene expression via a PPAR response element (PPRE) in the LPL promoter (38) and decreasing apo C-III levels (39). Besides, PPAR $\alpha$ -null mice, in our study, exhibit high levels of CD36/FAT which will again participate in high uptake of lipids by liver and will ultimately contribute to liver steatosis in these animals. Furthermore, the mRNA of SREBP1c is downregulated in control-PPAR $\alpha$ -null and WT-hyperglycaemic mice. SREBP1c controls the transcription of lipogenic genes. Hence, a high accumulation of TG and FFA in

the liver, due to high expression of FAT/CD36, might be responsible for the low expression of this transcription factor in these animals.

As far as the adipokines are concerned, we observed a concomitant increase in adiponectin and leptin mRNA in PPAR $\alpha$ -null mice and this increase might be due to higher adipose tissues in these animals as compared to WT mice. Our results on the high expression of leptin and adiponectin mRNA in PPAR $\alpha$ -null mice corroborate the observations of Bihan et al. (28) who have shown that the concentrations of these adipokines are elevated in PPAR $\alpha$ -null mice. As far as inflammation is concerned, high adiponectin may counterbalance the effects of leptin as the former is antiatherogenic and anti-inflammatory whereas the latter is pro-inflammatory (40). We further observed that in WT- and PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice, the mRNA transcripts of these two adipokines were downregulated and it was correlated to their lowered adipose tissue accumulation as compared to their respective controls. Our observations, in part, corroborate the findings of Bihan et al. (28) who have also shown that HF diet fed mice exhibited higher glucose levels and lower adiponectin concentrations than the standard diet animals.

In order to determine inflammation in adipocytes, we quantified the mRNA of well-known markers of macrophages. Surprisingly, we observed that the expression of mRNA of CD14 and CD68, but not F4/80, was upregulated in PPAR $\alpha$ -null mice. Indeed, F4/80 is the true marker of the macrophages and it seems that, in our study, these are the adipocytes, but not infiltrated macrophages, which are expressing CD14 and CD68. Our observations are in close agreement with the results of Khazen et al. (41) who have reported that murine and human adipose tissues express CD14 and CD68, but not F4/80, both at protein and mRNA levels. Besides, Cousin et al. (42) have demonstrated that preadipocytes can be differentiated into macrophage-like cells which are stained with MOMA-2, a marker of monocyte-macrophage lineage, but are negative for F4/80. Interestingly, hyperglycaemic conditions both in WT and PPAR $\alpha$ -null mice upregulated the expression of CD14 and CD68 mRNA and downregulated that of F4/80, suggesting an increase in inflammatory state of adipocytes in these animals.

MCP-1 has been known to be secreted by adipose tissues and this factor favours infiltration and the differentiation of the macrophages (19). We observed that PPAR $\alpha$ -null mice express lower MCP-1 mRNA than WT animals, suggesting the deletion of PPAR $\alpha$  gene accounts for the diminution of the population of macrophages in the adipose tissues. Consequently, the adipose tissues of PPAR $\alpha$ -null mice express lower IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$



mRNA than those of WT animals. However, IL-6 mRNA was upregulated in the adipose tissues, without any modification in the liver, in WT-hyperglycaemic mice. Hence, increased IL-6 might diminish not only insulin sensitivity by suppressing insulin signal transduction but also interfere with the anti-inflammatory effect of insulin, and might favour inflammation during hyperglycaemic state, in these animals as demonstrated by Dandona et al. (43). It is interesting to mention that 10-35 % of the body's basal circulating IL-6 is derived from adipose tissue and a positive correlation has been found between insulin resistance and circulating IL-6 levels (44). The high levels of glucose have been proposed to induce oxidative stress which may contribute to high IL-6 concentrations (45). In our study, hyperglycaemia may be one of the factors implicated in IL-6 mRNA expression. However, the reason why hyperglycaemia is not inducing upregulation of IL-6 in PPAR $\alpha$ -null mice is not well understood. Nonetheless, it is evident that the deletion of PPAR $\alpha$  gene results in lowered expression of pro-inflammatory cytokines like IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ .

RANTES has been considered as an adipokine and its receptor CCR5 has been expressed principally on infiltrated T-cells (21). In our study, we could not detect both the T-cells (as evidenced by the absence of TCR $\alpha$  mRNA) and CCR5 mRNA in adipose tissues of the mice. However, we observed that RANTES mRNA expression was diminished in adipose tissues of PPAR $\alpha$ -null mice. Adiponectin has been shown to regulate RANTES expression (21). High adiponectin mRNA in adipose tissues of these mice might be responsible for the downregulation of RANTES mRNA. Our hypothesis can be supported by the study of Wu et al. (21) who have shown that RANTES mRNA levels were negatively correlated with adiponectin in mouse adipose tissues. However, we observed that RANTES mRNA expression was also diminished in adipose tissues of WT- and PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice as compared to their respective controls. The diminution of RANTES mRNA in these animals is not well understood and further studies are required to explore this aspect.

*In vitro* differentiated adipocytes have been shown to express TLR-2 and TLR-4 (46). Since TLRs are the mediators of the cellular response to bacterial lipopolysaccharide (LPS), it is possible that during an antigenic (microbial) challenge, the adipocytes may play a role in immunomodulation (47). High expression of TLRs is associated with increased inflammation. The upregulation of TLR-2 and -4 mRNA in PPAR $\alpha$ -null mice suggests that PPAR $\alpha$  might be implicated in the modulation of endotoxemia. As far as the mechanism in the induction of TLR expression is concerned, we would like to state that leptin has been recently shown to induce the expression of TLR1-9 in adipocytes (48). In our study, high levels of leptin mRNA

in PPAR $\alpha$ -null mice might be responsible for the upregulation of TLR-2 and TLR-4 mRNA. TLR-2 mRNA was downregulated in PPAR $\alpha$ -null-, but not in WT-hyperglycaemic mice. It is further noteworthy that TLR-4 mRNAs were downregulated in both WT- and PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice. Similarly, the low leptin mRNA which may contribute to low leptin levels might be responsible for the low expression of these TLRs in hyperglycaemic conditions.

To sum up, our study demonstrates that PPAR $\alpha$  controls the transcription of insulin gene and modulates inflammation by downregulating the mRNA expression of certain pro-inflammatory mediators. However, further studies are required to clarify the role of PPAR $\alpha$ , in detail, in hyperglycaemic conditions.

### **Acknowledgements**

We thank Ministry of High Education, Republic of Benin, which granted a scholarship to Jean-Marc ATEGBO. We express our sincere thanks to Dr. FJ Gonzalez, National Cancer Institute who provided the PPAR $\alpha$ -null mice under the MTA number 1-23651-07.

## References

1. **Issemann IGS** 1990 Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650
2. **Wahli W** 2002 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly* 132:83-91
3. **Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W** 1996 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- $\alpha$ , - $\beta$ , and - $\gamma$  in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366
4. **Zambon A, Gervois P, Pauletto P, Fruchart JC, Staels B** 2006 Modulation of Hepatic Inflammatory Risk Markers of Cardiovascular Diseases by PPAR- $\alpha$  Activators. Clinical and Experimental Evidence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Epub ahead of print]
5. **Guillausseau PJ, Laloi-Michelin M** 2003 [Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus]. *Rev Med Interne* 24:730-737
6. **German K, Bedwani J, Davies J, Brading AF, Stephenson TP** 1994 An assessment of the contribution of visco-elastic factors in the aetiology of poor compliance in the human neuropathic bladder. *Br J Urol* 74:744-748
7. **Wicksteed B, Alarcon C, Briaud I, Lingohr MK, Rhodes CJ** 2003 Glucose-induced translational control of proinsulin biosynthesis is proportional to proinsulin mRNA levels in islet beta-cells but not regulated via a positive feedback of secreted insulin. *J Biol Chem* 278:42080-42090
8. **Tillmar L, Carlsson C, Welsh N** 2002 Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *J Biol Chem* 277:1099-1106
9. **Pagliassotti MJ, Knobel SM, Shahrokhi KA, Manzo AM, Hill JO** 1994 Time course of adaptation to a high-fat diet in obesity-resistant and obesity-prone rats. *Am J Physiol* 267:659-664
10. **Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC** 2007 High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15:798-808
11. **Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA** 2006 Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of T cell differentiation. *Endocrinology* 147:4410-4418

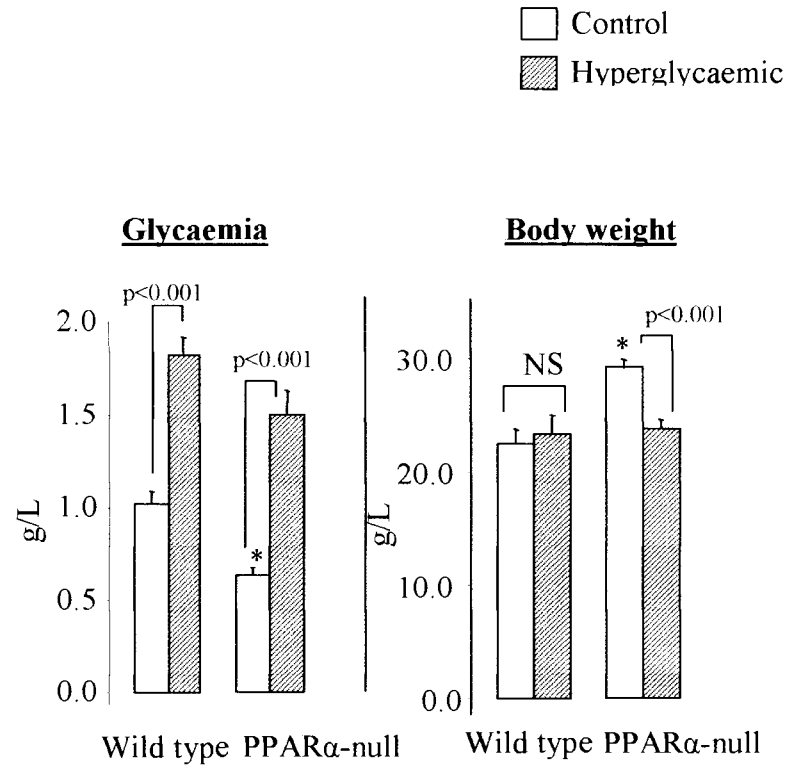
12. **Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W** 1999 Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103:1489–1498
13. **Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP** 1999 A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in the cellular fasting response: the PPAR $\alpha$ -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7473–7478
14. **Johnson JD, Ahmed NT, Luciani DS, Han Z, Tran H, Fujita J, Misler S, Edlund H, Polonsky KS** 2003 Increased islet apoptosis in PDX1 $\pm$  mice. *J Clin Invest* 111:1147–1160
15. **Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, Dela Cruz F, Schwitzgebel V, Hayes-Jordan A, German M** 2000 Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127:5533–5540
16. **Schisler JC, Jensen PB, Taylor DG, Becker TC, Knop FK, Takekawa S, German M, Weir GC, Lu D, Mirmira RG, Newgard CB** 2005 The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:7297–7302
17. **Docherty HM, Hay CW, Ferguson LA, Barrow J, Durward E, Docherty K** 2005 Relative contribution of PDX-1, MafA and E47/beta2 to the regulation of the human insulin promoter. *Biochem J* 389:813–820
18. **Libby P, Plutzky J** 2007 Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Am J Cardiol* 99:27B–40B
19. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr** 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796–1808
20. **Triantafilou M, Triantafilou K** 2002 Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster, *Trends Immunol* 23:301–304
21. **Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM** 2007 T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*. 115:1029–1038

22. **Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ** 1995 Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15:3012-3022
23. **Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH** 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497-509
24. **Slover HT, Lanza E** 1979 Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 56:933-943
25. **Bustin SA** 2000 Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25(2):169-193
26. **Ginzinger DG** 2000 Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30:503-512
27. **Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H** 1998 Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/PDX1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12:1763-1768
28. **Bihan H, Rouault C, Reach G, Poitout V, Staels B, Guerre-Millo M** 2005 Pancreatic islet response to hyperglycemia is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *FEBS Lett* 579:2284-2288
29. **Leibiger B, Moede T, Uhles S, Berggren PO, Leibiger IB** 2002 *Biochem Soc Trans* 30:312-317
30. **Lawrence MC, McGlynn K, Park BH, Cobb MH** 2005 ERK1/2-dependent activation of transcription factors required for acute and chronic effects of glucose on the insulin gene promoter. *J Biol Chem* 280:26751-26759
31. **Liu YQ, Nevin PW, Leahy JL** 2000 beta-cell adaptation in 60% pancreatectomy rats that preserves normoinsulinemia and normoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E68-73
32. **Wang MY, Koyama K, Shimabururo M, et al** 1998 Overexpression of leptin receptors in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats restores GLUT-2, glucokinase, and glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11921-11926

33. **Yoshikawa H, Tajiri Y, Sako Y, Hashimoto T, Umeda F, Nawata H** 2001 Effects of free fatty acids on beta-cell functions: a possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptors alpha or pancreatic/duodenal homeobox. *Metabolism* 50:613-618
34. **Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J** 1997 Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Biol Chem* 272:27307–27312
35. **Park CW, Kim HW, Ko SH, Chung HW, Lim SW, Yang CW, Chang YS, Sugawara A, Guan Y, Breyer MD** 2006 Accelerated diabetic nephropathy in mice lacking the Peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 55:885-893
36. **Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, Kelly DP** 1998 A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest* 102:1083–1091
37. **Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JR, Belke DD, Severson DL, Kelly DP, Lopaschuk GD** 2002 A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem* 277:4098–4103
38. **Schoonjans K, Painado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J** 1996 PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15:5336–5348
39. **Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongevillae J, Auwerx J** 1995 Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. *J Clin Invest* 95:705–712
40. **Diez JJ, Iglesias P** 2003 The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human and possible biological roles. *Eur J Endocrinol* 148:293-300
41. **Khazen W, M'bika JP, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, Forest C** 2005 Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Lett* 579:5631-5634

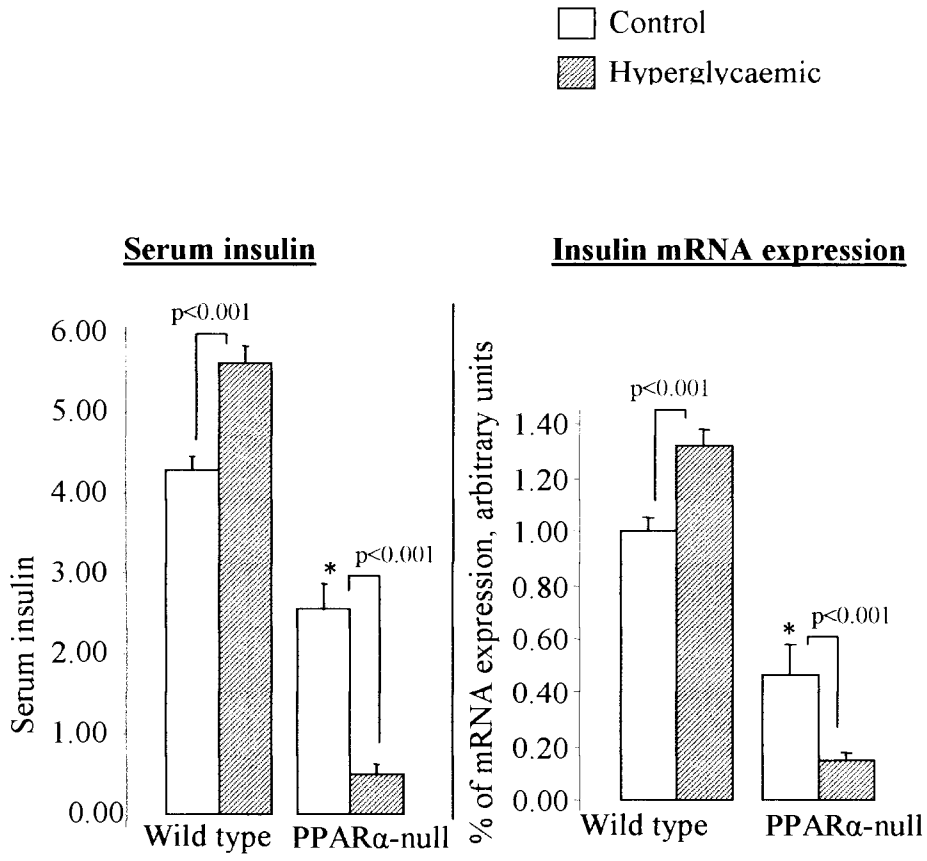
42. **Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Penicaud L** 1999 A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J* 13:305-312
43. **Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A** 2004 Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25: 4-7
44. **Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B** 2000 Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2084-2089
45. **Sternberg EM** 1992 The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 117:854-866
46. **Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE** 2000 The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J Biol Chem* 275:24255-24263
47. **Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher FM, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S** 2006 Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Epub ahead of print]
48. **Batra A, Pietsch J, Fedke I, Glauben R, Okur B, Stroh T, Zeitz M, Siegmund B** 2007 Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. *Am J Pathol* 170:1931-1941

**Figure 1**

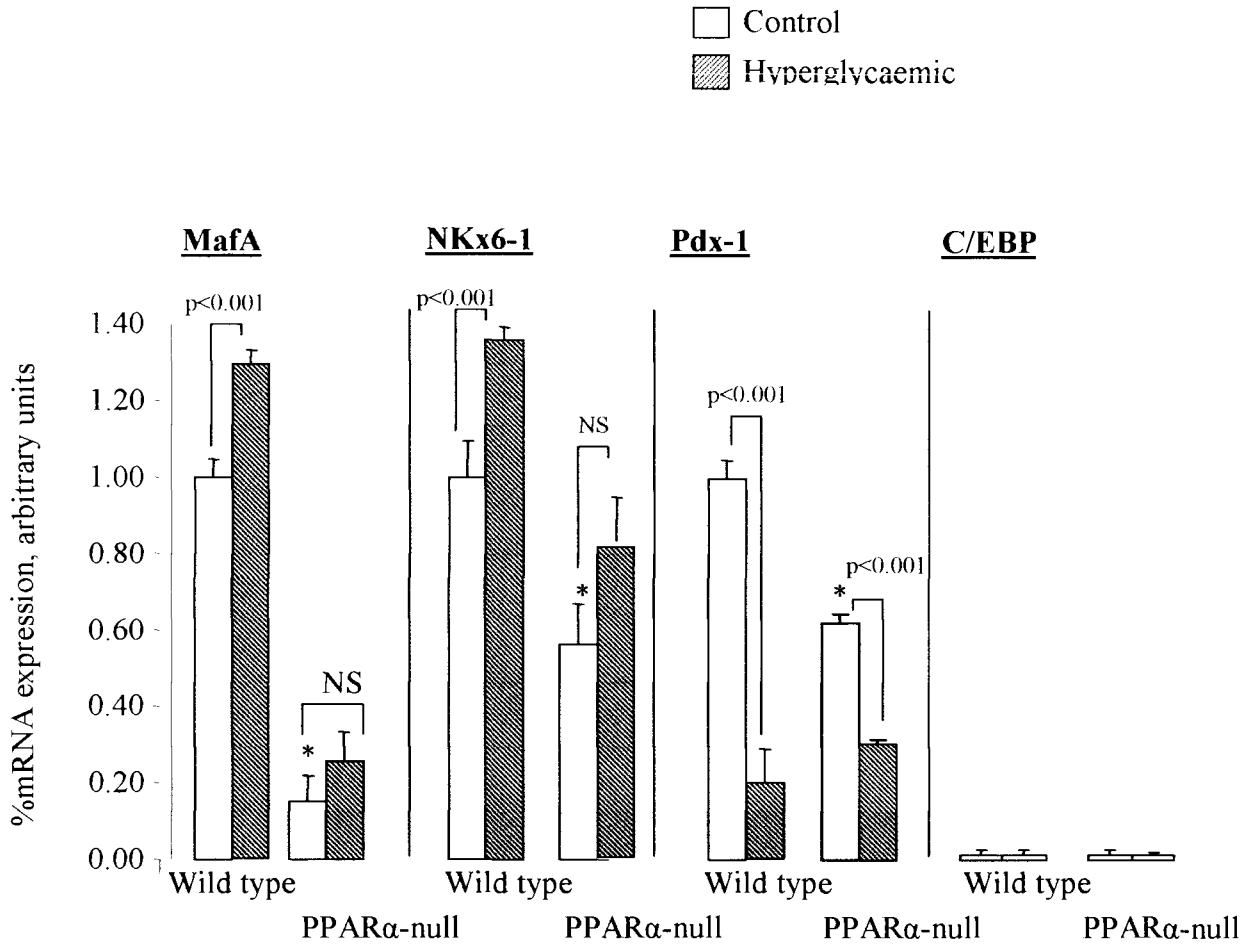




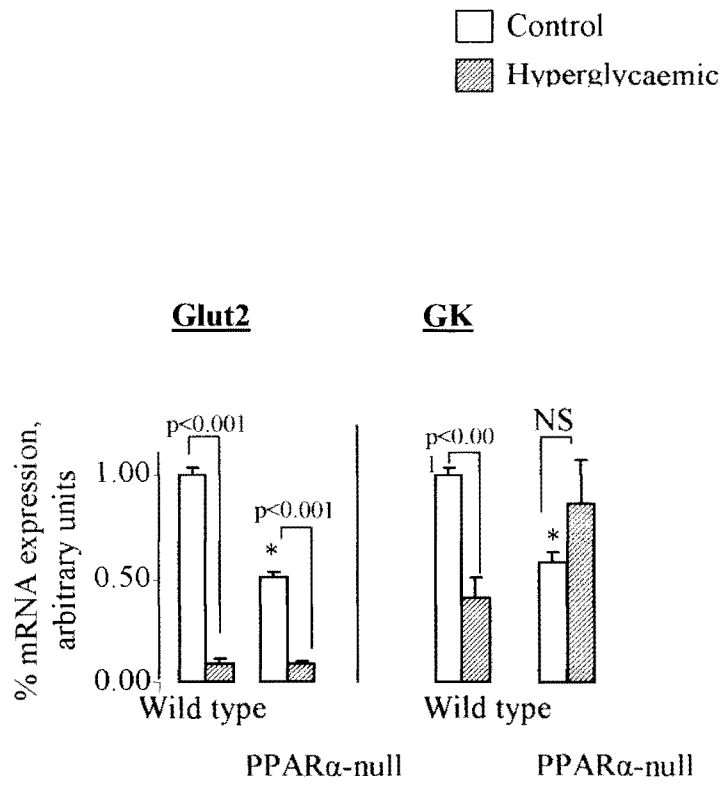
**Figure 2**



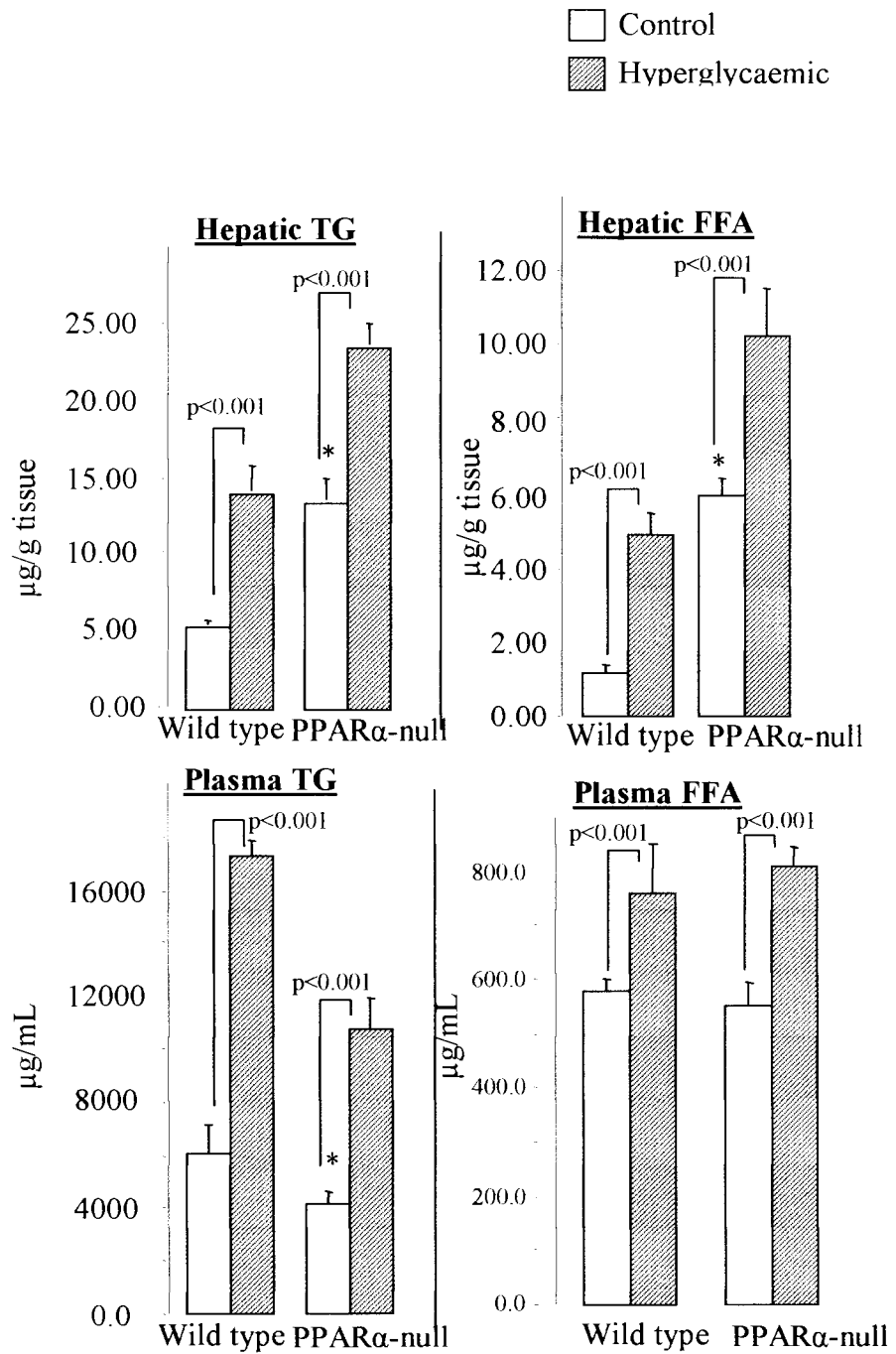
**Figure 3**



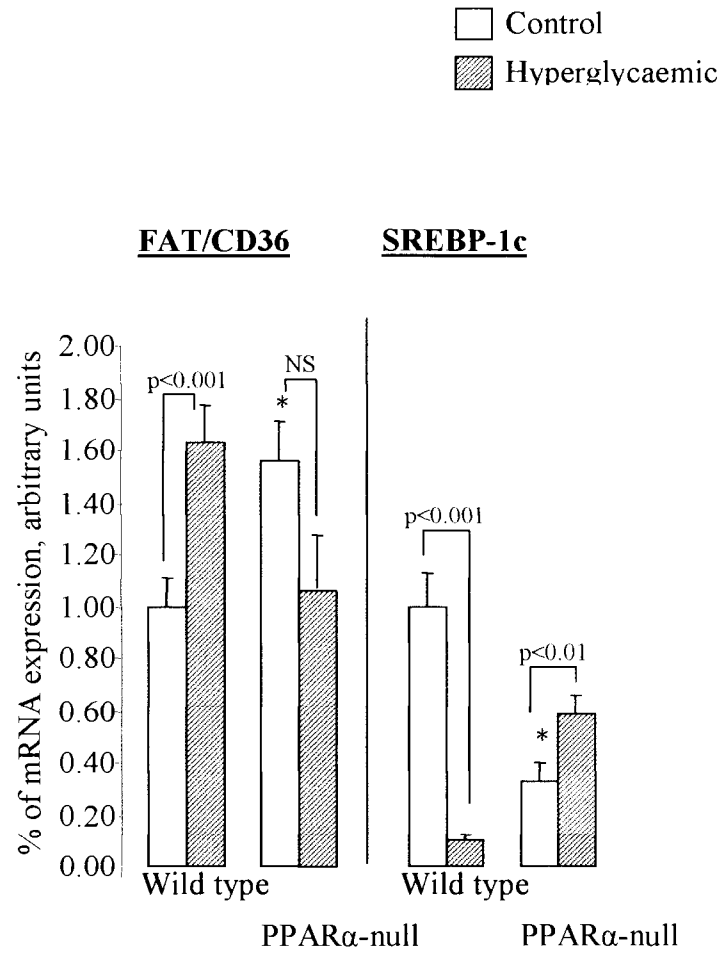
**Figure 4**



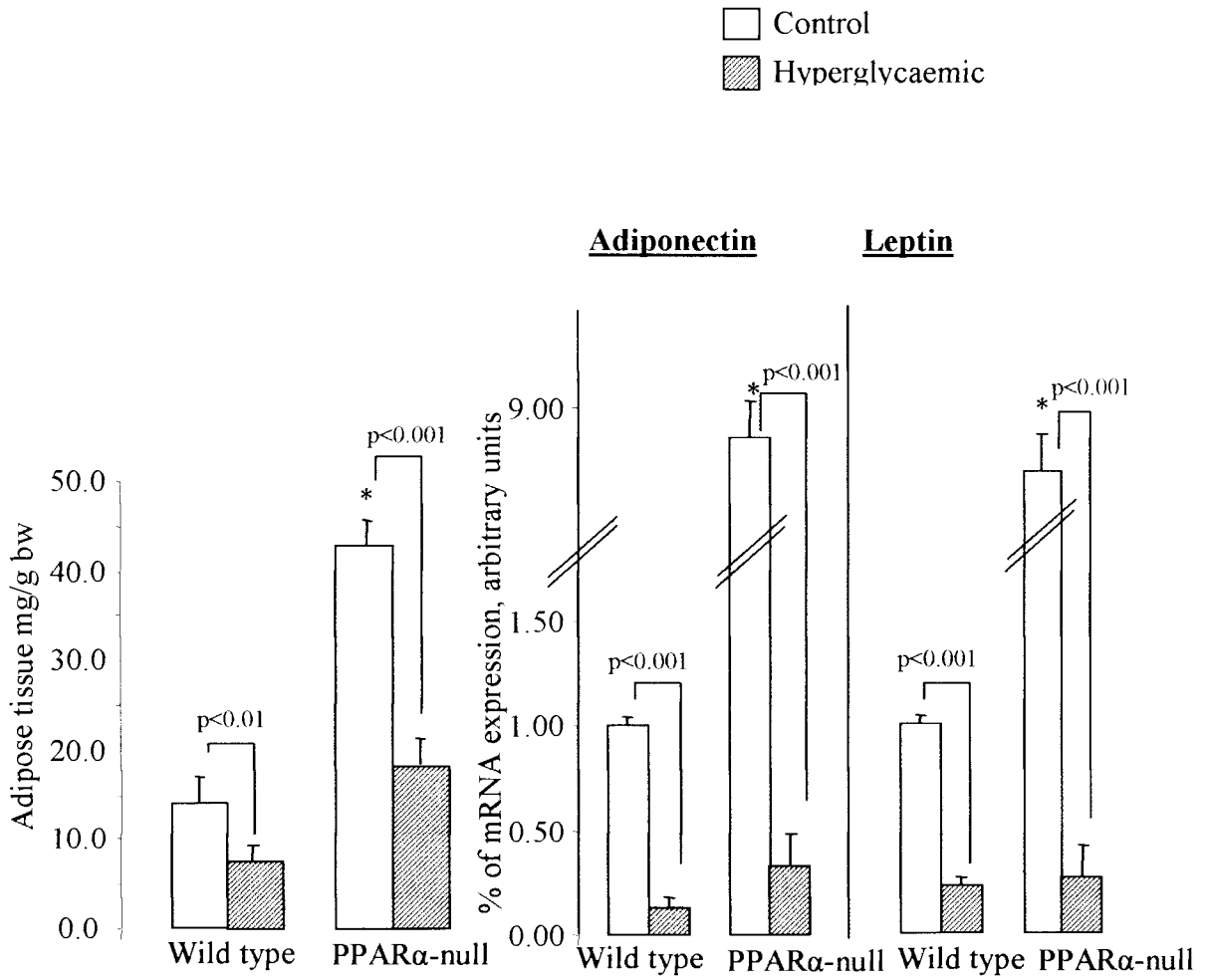
**Figure 5**



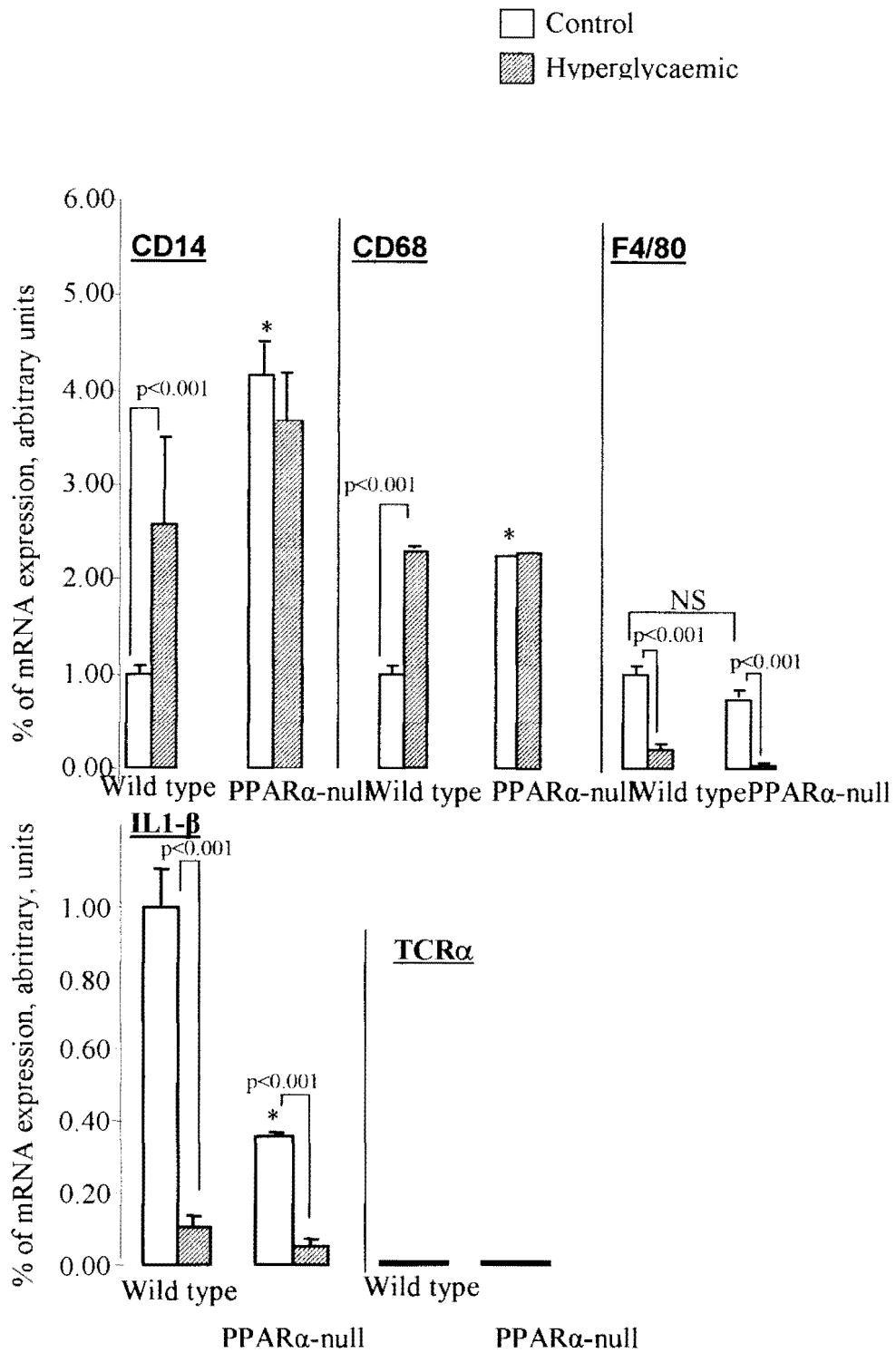
**Figure 6**



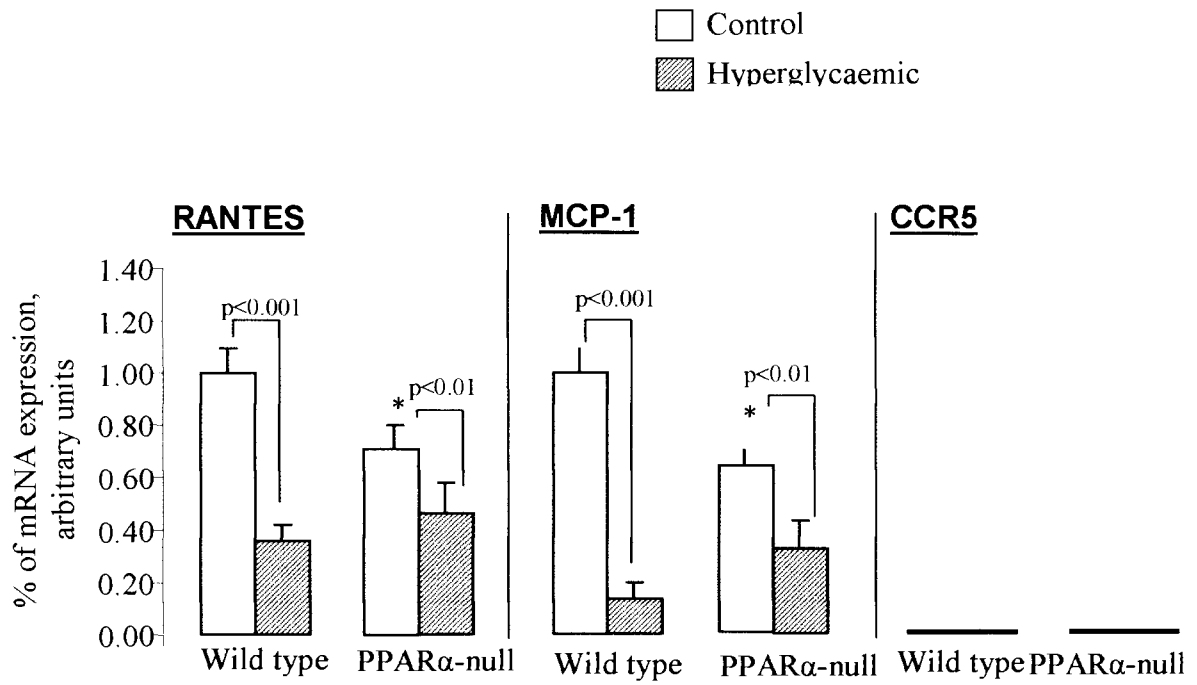
**Figure 7**



**Figure 8**

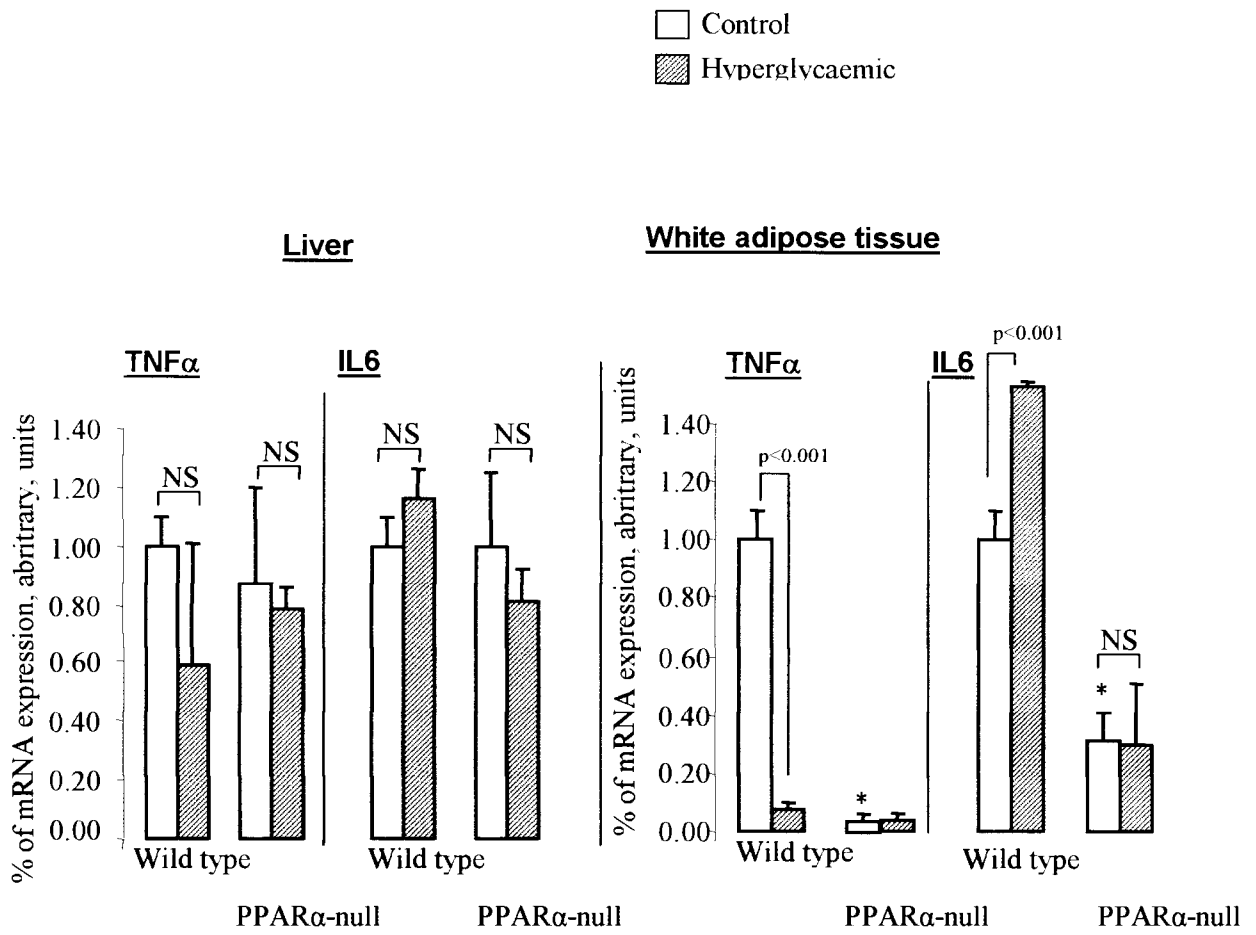


**Figure 9**

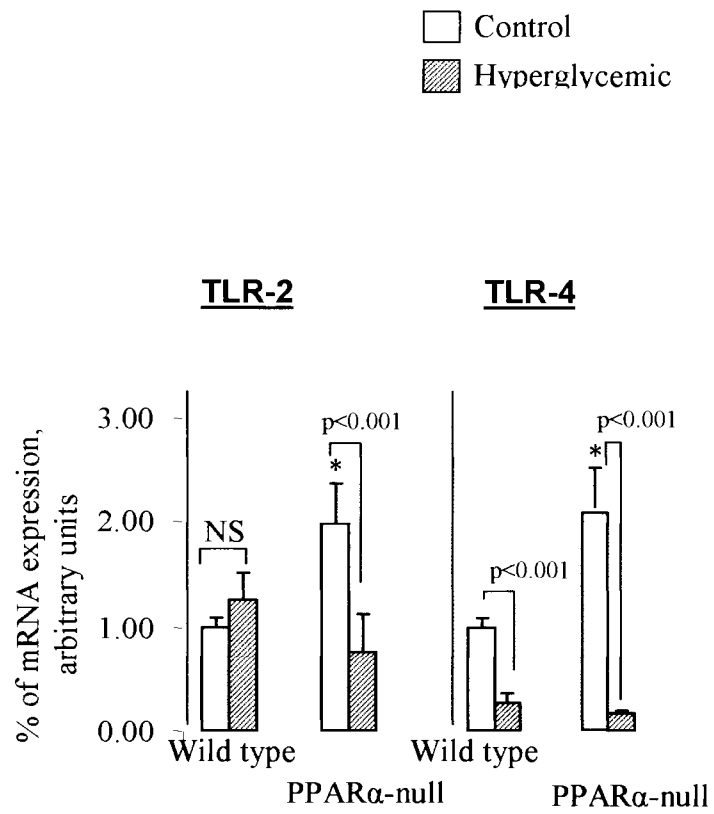




**Figure 10**



**Figure 11**



## Figure legends

### **Figure 1: Serum glycaemia and body weight**

The parameters were determined as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (WT mice); n = 54 (WT-hyperglycaemic mice); n = 104 (PPAR $\alpha$ -null mice); n = 16 (PPAR $\alpha$ -null-hyperglycaemic mice). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences (p<0.001) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice. NS=insignificant differences.

### **Figure 2: Serum insulin concentration, and insulin mRNA expression in the pancreas**

Serum insulin determination and expression of insulin mRNA were performed as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences (p<0.001) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice.

### **Figure 3: C/EBP- $\beta$ , PDX-1, MafA, and Nkx6-1 mRNA expression in pancreas of hyperglycaemic and control mice**

The expression of mRNA was quantitatively analyzed by employing real-time RT-PCR as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences (p<0.001) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice. NS=insignificant differences.

### **Figure 4: Glut2 and glucokinase mRNA expression in the pancreas of hyperglycaemic and control mice**

The expression of Glut2 and glucokinase mRNA was quantitatively analyzed by employing real-time RT-PCR as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -

null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences ( $p < 0.001$ ) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice. NS=insignificant differences.

**Figure 5: Plasma and hepatic triglyceride (TG) and free fatty acids (FFA) in the blood and the liver of hyperglycaemic and control mice**

The lipid parameters were determined as described in Materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences ( $p < 0.001$ ) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice.

**Figure 6: FAT/CD36 and SREPB-1c mRNA expression in liver of hyperglycaemic and control mice**

The expression of FAT/CD36 and SREPB-1c mRNA was quantitatively analyzed by employing real-time RT-PCR as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences ( $p < 0.001$ ) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice. NS=insignificant differences.

**Figure 7: Adipose tissue weight, and adiponectin and leptin mRNA expression in white adipose tissue of hyperglycaemic and control mice**

The expression of adiponectin and leptin mRNA was quantitatively analyzed by employing real-time RT-PCR as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences ( $p < 0.001$ ) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice.

**Figure 8: CD14, CD68, F4/80, IL1- $\beta$  and TCR $\alpha$  mRNA expression in white adipose tissue of hyperglycaemic and control mice**

The expression of CD14, CD68, F4/80, IL1- $\beta$  and TCR $\alpha$  mRNA was quantitatively analyzed by employing real-time RT-PCR as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences (p<0.001) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice.

**Figure 9: Rantes, MCP-1 and CCR5 mRNA expression in white adipose tissue of hyperglycaemic and control mice**

The expression of Rantes, MCP-1 and CCR5 mRNA was quantitatively analyzed by employing real-time RT-PCR as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences (p<0.001) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice.

**Figure 10: TNF $\alpha$  and IL-6 cytokines mRNA expression in liver and white adipose tissue of hyperglycaemic and control mice**

The expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA cytokine was quantitatively analyzed by employing real-time RT-PCR as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56 (offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences (p<0.001) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice. NS=insignificant differences.

**Figure 11: TLR-2 and TLR-4 mRNA expression in white adipose tissue of hyperglycaemic and control mice**

The expression of TLR2 and TLR4 mRNA was quantitatively analyzed by employing real-time RT-PCR as described in materials and methods section. Values are means  $\pm$  SEM, n = 56

(offspring of Wild Type control mothers); n = 54 (offspring of Wild Type diabetic mothers); n = 104 (offspring of PPAR $\alpha$ -null control mothers); n = 16 (offspring of PPAR $\alpha$ -null diabetic mothers). Each value is the mean of six determinations. Data were analyzed by two-way ANOVA. \*significant differences (p<0.001) between WT and PPAR $\alpha$ -null mice. NS=insignificant differences.

Table 1: Gene regions amplified and their corresponding primer sequences used for RT-PCR

Genes amplified	Primer sequences
Mouse Rantes	F: 5'-GCAGTCGTGTTTGTCACCTCG-3' R: 5'-TAGGACTAGAGCAAGCGATGAC-3'
Mouse CCR5	F: 5'-GCCTAAACCCTGTCATCTATGC-3' R: 5'-ATATTTCCCGCCCTGATAAAAAG-3'
Mouse MCP-1	F: 5'-GAGAGCCAGACGGGAGGAAG-3' R: 5'-TGAATGAGTAGCAGCAGGTGAG-3'
Mouse CD68	F: 5'-TTCAGGGTGAAGAAAGGTAAGC-3' R: 5'-CAATGATGAGAGGCAGCAAGAGG-3'
Mouse IL-6	F: 5'-CCGCTATGAAGTTCCTCTCTGC-3' R: 5'-ATCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCC-3'
Mouse TCR- $\alpha$	F: 5'-CCTCTACAGCAGCGTTCTCATCC-3' R: 5'-GGGTAGGTGGCGTTGGTCTCTTTG-3'
Mouse CD14	F: 5'-GCGTGTGCTTGGCTTGTTG-3' R: 5'-CAGGGCTCCGAATAGAATCCG-3'
Mouse F4/80	F: 5'-TCCAGCACATCCAGCCAAAGC-3' R: 5'-CCTCCACTAGCATCCAGAAGAAGC-3'
Mouse IL-1 $\beta$	F: 5'-TGTTCTTTGAAGTTGACGGACCC-3' R: 5'-TCATCTCGGAGCCTGTAGTGC-3'
Mouse TLR2	F: 5'-CTACAGTGAGCAGGATTCC-3' R: 5'-CAGCAAAACAAGGATGGC-3'
Mouse TLR4	F: 5'-GCAGCAGGTGGAATTGTATCG-3' R: 5'-GCTTAGCAGCCATGTGTTCC-3'
Mouse TNF- $\alpha$	F: 5'-CTCTTCTCATTCTGCTTGTGG-3' R: 5'-AATCGGCTGACGGTGTGG-3'
Mouse SREBP-1c	F: 5'-CATCAACAACCAAGACAGTC-3' R: 5'-CCAGAGAAGCAGAAGAGAAG-3'
Mouse FAT/CD36	F: 5'-TGCTCTCCCTTGATTCTGCTGC-3' R: 5'-TTTGCTGCTGTTCTTTGCCACG-3'
Mouse Adiponectin	F: 5'-GCCGCTTATGTGTATCGCTCAG-3' R: 5'-GCCAGTGCTGCCGTCATAATG-3'
Mouse Leptin	F: 5'-ACACACGCAGTCGGTATCC-3' R: 5'-GAGTAGAGTGAGGCTTCCAGG-3'
Mouse PDX-1	F: 5'-CTACTGCCTTCGGGCCTTAG-3' R: 5'-TTGGAACGCTCAAGTTTGTACC-3'
Mouse Glucokinase	F: 5'-AGAAGGCTCAGAAGTTGGAGAC-3' R: 5'-GGATGGAATACATCTGGTGTTCG-3'
Mouse insulin	F: 5'-GTGGCTTCTTCTACACACCCAT-3' R: 5'-CTCCAGTGCCAAGGTCTGAA-3'
Mouse Glut 2	F: 5'-TGTGGTGTGCTGTTTGTG-3' R: 5'-AATGAAGTTTGAAGTCCAGTTGG-3'
Mouse C/EPB- $\beta$	F: 5'-AGCTGAGCGACGAGTACAAG-3' R: 5'-AGCTGCTCCACCTTCTTCTC-3'
Mouse MafA	F: 5'-ATCACTCTGCCACCATCAC-3' R: 5'-CGCCAACCTCTCGTATTTCTCC-3'
Mouse Nkx6-1	F: 5'-GGGTCTTCTCCTCCTCCTC-3' R: 5'-GGTCTGGTGTGTTTTCTTCC-3'

## **Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$ gene modulates pancreatic transcriptional factors and inflammation in adipose tissues in normal and hyperglycaemic mice (*Soumis*)**

Akadiri Yessoufou\*,<sup>1,3</sup> Jean-Marc Atègbo\*,<sup>2,3</sup> Eugène Attakpa,<sup>2,3</sup> Aziz Hichami,<sup>3</sup> Kabirou Moutairou,<sup>1</sup> Karim L. Dramane,<sup>2</sup> Naim Akhtar Khan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA), <sup>2</sup>Département de Physiologie Animale, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin. <sup>3</sup>UPRES EA 4183 Lipides et Signalisation Cellulaire, Faculté des Sciences de la Vie, Université de Bourgogne, 6 Boulevard Gabriel, 21 000 Dijon, France.

### **Résumé:**

Nous évaluons l'implication de la déficience de PPAR $\alpha$  dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et l'inflammation des adipocytes chez les souris adultes C57BL/6J nées de mères normales (WT) et de mères PPAR $\alpha$ -null diabétiques. A jeun, les souris adultes issues de mères WT diabétiques et de PPAR $\alpha$ -null diabétiques sont hyperglycémiques bien que les souris PPAR $\alpha$ -null contrôles soient hypoglycémiques. La concentration en insuline et l'expression de ses ARNm pancréatiques sont élevées chez les souris WT hyperglycémiques alors que leurs homologues PPAR $\alpha$ -null hyperglycémiques présentaient des taux faibles, suggérant que la suppression du gène de PPAR $\alpha$  contribuait à la faible transcription de ces gènes. En conditions normale et hyperglycémique, la suppression du gène de PPAR $\alpha$  aboutit à la diminution des facteurs de transcription des gènes de l'insuline comme Pdx-1, Nkx6.1 et MafA, quoique l'hyperglycémie augmente l'expression de Nkx6.1 et de MafA chez les souris WT. En outre, la capacité pancréatique fonctionnelle est aussi détériorée par la suppression du gène de PPAR $\alpha$  puisque le pancréas des souris PPAR $\alpha$ -null exprime de faibles taux de Glut 2 et de glucokinase. Les souris PPAR $\alpha$ -null expriment des taux élevés d'adiponectine et de leptine comparées aux souris WT et ces adipokines sont faiblement exprimées à la fois chez les souris WT et chez les souris PPAR $\alpha$ -null en condition hyperglycémique. Dans les tissus adipeux, les souris PPAR $\alpha$ -null présentent une augmentation de l'expression de CD14 et CD68 généralement exprimés par les macrophages. L'hyperglycémie augmente cette expression chez les souris WT mais pas chez les souris PPAR $\alpha$ -null. La suppression du gène de PPAR $\alpha$  diminue, au niveau des adipocytes, l'expression de MCP-1, TNF $\alpha$ , IL-6 et RANTES, alors que l'expression de TLR-2 et de TLR-4 (récepteurs pro-inflammatoires) était élevée dans les tissus adipeux. Pris ensemble, nos résultats suggèrent qu'en conditions normale et hyperglycémique, la déficience en PPAR $\alpha$  chez les souris est impliquée dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et le statut inflammatoire du tissu adipeux.

**Mots clés :** Insulino-résistance, ARNm, PPAR $\alpha$ , inflammation, hyperglycémie



TROISIEME PARTIE: DISCUSSION  
GENERALE ET PERSPECTIVES

# 1. Discussion générale

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

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

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

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

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

Les adipokines, sécrétées par le tissu adipeux, sont nécessaires pour bons nombres de processus physiologiques et métaboliques (Trayhumm et coll., 2004). En dépit de

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

La leptine est une cytokine principalement produite et sécrétée dans la circulation sanguine par les adipocytes (Zhang et coll., 1994). Son action principale est de diminuer la prise alimentaire grâce à sa fixation sur l'hypothalamus (via ses récepteurs, l'alpha-msh et le neuropeptide Y) ventro-médian (Halaas et coll., 1995). ***Dans la présente étude, nous avons constaté que les concentrations en leptine étaient très élevées chez les femmes souffrant du diabète gestationnel comparées aux mères contrôles.*** Il existe une controverse à propos des taux de leptine des mères diabétiques. Ces taux ont été rapportés soit élevés (Kautzky-Willer et coll., 2001), soit inchangés (Simmons et coll., 2002), ou réduits (Festa et coll., 1999) dans les grossesses compliquées par le diabète, quoiqu'une étude récente (McLachlan et coll.,

2006) ait montré que les concentrations en leptine maternelle sont élevées chez les femmes GDM. Ce désaccord serait le résultat des différences entre le moment du prélèvement du sang maternel (c'est-à-dire l'âge gestationnel). Toutefois, les fortes concentrations en leptine au cours du diabète gestationnel seraient le résultat de sa sécrétion par les adipocytes en présence de fortes concentrations d'oestrogène (Sivan et coll., 1998) et du placenta (Masuzaki et coll., 1997). En fait la leptine, agissant comme un signal augmentant la dépense énergétique en majorant la thermogénèse, est élevée avec persistance chez les femmes ayant eu le diabète gestationnel après la délivrance et associée à l'hyperglycémie et à l'insulino-résistance (Kautzky-Willer et coll., 2001). Il est aussi possible que l'hyperleptinémie des femmes GDM ait favorisé le développement de la macrosomie chez les foetus. Comme TNF- $\alpha$  et IL-6, les taux élevés de leptine observés pourraient induire un stress oxydatif qui serait, par la suite, impliqué dans la libération des médiateurs inflammatoires (Matarese et coll., 2002)

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

## **1. 2. Profil des cytokines Th1 et Th2 au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie**

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

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

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

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

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

antioxydant et le profil des lipides circulants chez les mères diabétiques et leurs progénitures macrosomiques.

### **1. 3. Statut antioxydant, diabète gestationnel et macrosomie**

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

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

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

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

#### **1. 4. Profil des lipides circulants au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie**

Dans la présente étude, ***les mères GDM aussi bien que les mères contrôles avaient une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie***, quoique ces paramètres ne fussent pas statistiquement différents. ***Les bébés macrosomiques présentaient des taux élevés en triglycérides et en cholestérol total et libre comparés aux nouveau-nés témoins (Article n°2)***. Nos résultats confirment plusieurs études qui ont montré que les taux en cholestérol total et en triglycérides sont significativement élevés pendant la grossesse et qu'il n'y avait pas de différence significative entre mères diabétique et contrôle (Toescu et coll., 2004 ; Di Cianni et coll., 2005).

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

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

Plusieurs altérations, observées à la naissance chez des enfants issus de mères diabétiques, tant dans le métabolisme des carbohydrates et des lipides, que dans le système immunitaire, persistent encore à l'âge adulte (Fowden, 1989 ; Cordero et coll., 1993 ; Pribylova et coll., 1996 ; Plagemann et coll., 1997 ; Merzouk et coll., 1999, 2000 ;



Sameshima et coll., 2000 ; Schwartz et coll., 2000 ; Jimenez-Moleon et coll., 2002). *Existe-t-il le rôle d'une "mémoire métabolique" in utero au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie ? (Article 3).*

### **1. 5. La "mémoire métabolique" in utero semble être impliquée dans la macrosomie au cours du diabète gestationnel**

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

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

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

## **1. 6. PPAR- $\alpha$ module l'activation des cellules-T au cours du diabète gestationnel**

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes (PPARs) sont des facteurs de transcription qui régulent un grand nombre de gènes par l'activation transcriptionnelle et la répression (Zambon et coll., 2006). Les trois isotopes ont été identifiés chez les vertébrés inférieurs et les mammifères (Marx et coll., 2002). PPAR- $\alpha$  joue un rôle important dans la régulation de maladies chroniques telles que le diabète, l'obésité et l'athérosclérose. Plusieurs auteurs ont identifiés PPAR- $\alpha$  dans les lymphocytes et son expression décroît peu après l'activation lymphocytaire (Evers et coll., 2004). En effet, il a été montré que les ligands de PPAR- $\alpha$  régulent les réponses inflammatoires, puisqu'ils peuvent inhiber la production de l'IL-2, la prolifération des cellules-T et augmenter l'expression de l'IL-4 (Evers et coll., 2004). La plupart de ces résultats plaident en faveur de l'effet immunosuppresseur de PPAR- $\alpha$  qui peut favoriser les cytokines Th2 nécessaires pour le succès de la grossesse (Issemann et coll., 1993).

Une étude a été conduite par Yessoufou et coll., (2006) chez des souris wild type et PPAR- $\alpha$  null dans le but d'évaluer l'implication de PPAR- $\alpha$  dans la modulation de la différenciation des cellules-T chez des souris gestantes diabétiques et leurs nouveau-nés. Ils constatèrent que 50% des souris PPAR- $\alpha$  null ayant le diabète gestationnel avortaient, tandis que le taux d'avortement était seulement de 8,3% chez les mères wild type diabétiques. De même, un fort taux de mortalité a été observé chez les nouveau-nés d'animaux PPAR- $\alpha$  null diabétiques. Les résultats indiquent que l'équilibre Th1/Th2 évoluait, chez les souris wild type diabétiques, vers le phénotype Th2 protégeant la grossesse et chez les mères PPAR- $\alpha$  null diabétiques, vers l'immunité nocive Th1 (Yessoufou et coll., 2006). Il est aussi intéressant de mentionner que le modèle de souris diffère de celui de rat car il a été impossible d'obtenir des nouveau-nés macrosomiques du premier bien que ces animaux montraient les signes de l'insulino-résistance, c'est-à-dire l'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie. Aussi, ce qui est remarquable, c'est que les bébés issus de mères PPAR- $\alpha$  null diabétiques étaient hypoinsulinémiques et hyperglycémiques. Par conséquent, nous pouvons énoncer que PPAR- $\alpha$  peut être impliqué dans la prévention de l'avortement maternel, la survie néonatale et la différenciation des cellules-T au cours du diabète gestationnel chez la souris. En conditions normale et hyperglycémique, la déficience en PPAR $\alpha$  chez les souris est impliquée dans la modulation de la transcription des gènes de l'insuline et le statut inflammatoire du tissu adipeux.

## 2. Perspectives

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

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

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

- L'insulino-résistance s'accompagne d'une baisse de **I'IGF-1** (*Insulin-like Growth Factor 1*) et de sa protéine porteuse, l' **IGFBP-3** (*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3*). Il s'agira donc d'**évaluer le profil des hormones de croissance** chez les femmes ayant le diabète gestationnel et leurs bébés macrosomiques.

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

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

\* L'effet thérapeutique du **sang du cordon ombilical** a été souvent évoqué. Récemment, des essais ont été réalisés par une équipe américaine (résultats non publiés) sur

des enfants ayant le diabète de type 1 auxquels a été injecté le sang du cordon ombilical où est détectée la totalité des cellules T activées. Les résultats obtenus indiquent que cette thérapie permettait de diminuer de moitié la dose journalière d'insuline requise et pourrait guérir à terme l'enfant. **Nous nous proposons donc de déterminer, à travers divers dosages, les éléments anti-inflammatoires qui y sont contenus.**

\* **Femibion®** est un complexe vitaminique oral. En Allemagne, Femibion®400-DHA est recommandé aux femmes enceintes dès la 13<sup>e</sup> semaine de grossesse. Puisque DHA exerce des effets bénéfiques sur le diabète gestationnel et la macrosomie, nous envisageons démontrer l'hypothèse selon laquelle cette molécule, administrée 15 jours avant la grossesse, produirait des effets bénéfiques sur le diabète gestationnel et diminuerait l'incidence de la macrosomie. Il s'agira donc pour nous **d'évaluer l'efficacité de Femibion®400-DHA dans la modulation du statut antioxydant et du profil inflammatoire du diabète gestationnel et sur l'incidence de la macrosomie.**

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

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

**mécanismes impliqués dans cette programmation. C'est donc un vaste enjeu que de les déterminer.**

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

ANNEXE

*Publication n°5*

**Cassava enriched diet is not diabetogenic rather it aggravates diabetes in rats**

Akadiri Yessoufou, **Jean-Marc Atègbo**, Aurélie Girard, Josiane Prost, Karim L. Dramane, Kabirou Moutairou, Aziz Hichami, Naim A. Khan

*Fundam Clin Pharmacol* 2006; **20**: 579-586.

*Objectif de l'étude*

Certaines études ont évoqué l'implication du manioc dans la pathogenèse du diabète lié à la malnutrition (diabète tropical). Le but de cette étude a été donc d'évaluer l'effet de la consommation du manioc du Bénin sur la progression du diabète expérimental chez le rat.

Cassava-enriched diet is not diabetogenic  
rather it aggravates diabetes in ratsAkadiri Yessoufou<sup>a,b</sup>, Jean-Marc Ategbo<sup>c</sup>, Aurelie Girard<sup>a</sup>, Josiane Prost<sup>a</sup>,  
Karim L. Dramane<sup>c</sup>, Kabirou Moutairou<sup>b</sup>, Aziz Hichami<sup>a</sup>, Naim A. Khan<sup>a\*</sup><sup>a</sup>Department of Physiology, UPRES Lipids and Nutrition, Faculty of Life Sciences, University of Bourgogne, Dijon, France<sup>b</sup>Laboratory of Cell Biology and Physiology, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin<sup>c</sup>Laboratory of Pharmacodynamics, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin**Keywords**antioxidant status,  
cassava toxicity,  
diabetes,  
ratsReceived 18 April 2006,  
revised 26 June 2006,  
accepted 11 August 2006\*Correspondence and reprints:  
naim.khan@u-bourgogne.fr**ABSTRACT**

Chronic intake of cassava has been thought to play a role in the pathogenesis of diabetes. We investigated the effects of dietary cassava (*Manihot esculenta*), which naturally contains cyanogenic glycosides, in the progression of diabetes mellitus in rats. Diabetes was induced by five mild doses of streptozotocin, in male Wistar rats which were fed a standard or cyanide-free cassava (CFC) diet containing or not containing exogenous cyanide with or without methionine. Methionine was employed to counterbalance the toxic effects of cyanide. During diabetes progression, we determined glycaemia and antioxidant status, by measuring vitamin C levels and activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione reductase (GSSG-Red). Feeding CFC diet did not induce diabetes in control rats; rather this diet, in diabetic animals, aggravated hyperglycaemia the severity of which was increased in these animals fed CFC diet, supplemented with cyanide. Addition of methionine curtailed the toxic effects of cyanide supplementation in CFC diet-fed diabetic animals. In standard diet-fed animals, the activities of SOD, GSH-Px and GSSG-Red were lower in diabetic rats than control rats. Interestingly, all of the CFC diets with or without cyanide or methionine, increased vitamin C levels and antioxidant enzyme activities in both control and diabetic animals. However, supplementing cyanide to CFC diet (without methionine) curtailed SOD and GSH-Px activities in diabetic rats. Our study shows that cassava diet containing cyanide is 'diabetes-aggravating'.

**INTRODUCTION**

Cassava is a tuber from a plant named *Manihot esculenta* which is widely cultivated in more than 80 tropical countries and often consumed as a staple food. Cassava, being low in protein contents, provides a cheap source of carbohydrates. Cassava is known to contain cyanogenic glycosides, linamarin and lotaustralin [1,2]. Several studies have linked cassava consumption to goitre [3] and neurological disorders [4]. Several investigators [5,6] have also reported the relationship between dietary intake of cassava and incidence of fibrocalculous pancreatic diabetes (FCPD) or malnutrition-related diabetes mellitus (MRDM), considered as a separate sub-class of

diabetes [7]. This form of diabetes, often seen in tropical areas of India, Asia and Africa, is severe and insulin-requiring although there is ketosis resistance in this pathology [5,8]. On the other hand, many epidemiological reports have failed to establish a co-relationship between the prevalence of MRDM and cassava consumption or protein malnutrition [9,10]. Swai et al. [11] have reported that high dietary cyanide did not have a significant effect on the prevalence of diabetes in an undernourished population in Tanzania. For these authors, feeding cassava is thus highly unlikely to be a major aetiological factor in so-called MRDM, at least in East Africa. The aetiology of this disease remains unclear although cassava cyanide toxicity [6], antioxidant



deficiency and a genetic predisposition have been proposed [12,13].

Keeping in view the above-mentioned controversial studies on the implication of cassava in the induction of diabetes mellitus, it was thought worthwhile to undertake a study to assess the effects of cassava consumption with and without methionine content, and/or cyanide supplementation in an experimental diabetic model.

## MATERIALS AND METHODS

### Cassava (tapioca) collection

Twelve different varieties of cassava flour samples were collected from the International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Republic of Benin. All the flour samples were certified cyanide-free by the IITA. These cassavas, cultivated in Benin and Nigeria (West Africa), have been named as follows: Amala, Somidoloro, Olichutè, Idilerou, TMS 92/0057, TMS 30572, TMS 920326, TMS 91934, K/195, Gbeze, Agric and Odumgbo. All the flour samples were mixed for the preparation of cyanide-free cassava (CFC) diets.

### Animals and diets

Three-month-old male Wistar rats, weighing  $200 \pm 15$  g, were obtained from IFA-CREDO (Abresle, France). After 1 week of acclimation, animals were divided into two diet groups. Rats were fed diets for 15 days before diabetes induction. Standard diet was prepared as described elsewhere [14]. The experimental diets (A, B, C and D) or CFC diets were prepared from the cassava flour samples obtained from the tuber. The chemical compositions of the diets are presented in *Table 1*.

Cyanide-free cassava represented minimum of 50% of experimental diets. Methionine was added to the diets to obviate the deficiency of sulphur-containing amino acids and for the cyanide detoxification. The diets C and D were supplemented with a sub-lethal dose (0.19%) of potassium cyanide [15], as cassava tuber is known to contain cyanogenic glycosides [2,16]. The energy deficiency, because of the absence of methionine in diets A, B and C, was compensated by increasing CFC contents. The standard and experimental diets were therefore isoenergetic. Lipid content was supplied as vegetable oil-Isio-4 (Lesieur, Neuilly-sur-Seine, France) which contained essential fatty acids [mg/g; 47.2, 18:2 (n-6); 1.7, total (n-3); and 40.2, monounsaturated fatty acids (largely 18:1)]. The composition of the mineral and the vitamin mix was identical as described by Triboulot *et al.* [17]. Diets were prepared every day and the rats

**Table 1** Composition of standard and cyanide-free cassava (CFC) diets (g/kg of diet).

Compositions	Standard diet	CFC-based diets			
		Diet A	Diet B	Diet C	Diet D
Starch	587	85	85	85	85
Tapioca (cassava) <sup>c</sup>		502	505	503.1	500.1
Potassium cyanide <sup>a</sup>				1.9	1.9
DL-Methionine	3	3			3
Casein	200	200	200	200	200
Sucrose	50	50	50	50	50
Cellulose	50	50	50	50	50
Mineral mix <sup>b</sup>	40	40	40	40	40
Vitamin mix <sup>b</sup>	20	20	20	20	20
Oil Isio-4	50	50	50	50	50
Total	1000	1000	1000	1000	1000

Values are in g per kg of the diet.

<sup>a</sup>Cyanide (ProLabo, Normapur®, Paris, France) in sub-lethal dose according to Akanji and Famuyiwa [15].

<sup>b</sup>Composition, according to Triboulot *et al.* [17].

<sup>c</sup>Cassava flours were certified as cyanide-free by International Institute of Tropical Agriculture (Cotonou, Benin).

consumed them *ad libitum*. Animals had free access to water. Uneaten food was discarded; food cups and water bottles were washed frequently. Rats were housed individually in stainless steel cages in a room maintained at 22 °C with a 12-h light–dark cycle. All the animals were weighed before and during diabetes induction and diet feeding throughout the study.

### Induction of diabetes mellitus

In each diet group, a total number of 25 rats were rendered diabetic by intraperitoneal (i.p.) injection of five low doses of streptozotocin (20 mg/kg body weight) in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5. In each diet group, 10 animals were injected with vehicle alone as controls.

The experimental protocol was approved by the local Ethical Committee and the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. The general guidelines for the care and use of laboratory animals, recommended by the Council of European Economic Communities, were followed.

### Blood samples

After overnight fasting, in each diet group and at each experimental point, at third and seventh day after the last injection of STZ, i.e. on day 8 and day 12, a half of

Table II Plasma glucose and insulin concentrations in control and diabetic rats.

	Standard diet		Cyanide-free cassava (CFC)-based diets				
			Diet A		Diet B	Diet C	Diet D
	Control rats (n = 10)	Diabetic rats (n = 12)	Control rats (n = 10)	Diabetic rats (n = 12)	Diabetic rats (n = 12)	Diabetic rats (n = 12)	Diabetic rats (n = 12)
Glycaemia (mm)							
Day 8	5.41 ± 0.22	12.39 ± 0.72 <sup>a</sup>	5.44 ± 0.79	14.94 ± 0.27 <sup>ab</sup>	21.97 ± 1.47 <sup>ab</sup>	22.67 ± 0.58 <sup>ab</sup>	11.58 ± 1.16 <sup>a</sup>
Day 12	5.41 ± 0.22	14.44 ± 1.11 <sup>a</sup>	5.44 ± 0.47	17.86 ± 0.72 <sup>ab</sup>	23.89 ± 0.63 <sup>ab</sup>	24.69 ± 1.04 <sup>ab</sup>	17.69 ± 0.50 <sup>ab</sup>
Insulin (pmol/L)							
Day 8	150.6 ± 10.9	95.6 ± 8.3 <sup>a</sup>	149.7 ± 11.9	75.8 ± 4.4 <sup>ab</sup>	59.8 ± 6.1 <sup>ab</sup>	48.8 ± 4.2 <sup>ab</sup>	101.8 ± 8.5 <sup>d</sup>
Day 12	155.9 ± 14.5	91.5 ± 9.6 <sup>a</sup>	148.1 ± 13.3	69.1 ± 5.6 <sup>ab</sup>	55.9 ± 5.7 <sup>ab</sup>	51.2 ± 3.9 <sup>ab</sup>	68.5 ± 7.1 <sup>ab</sup>

Plasma glucose and insulin concentrations were determined as described in Materials and methods section. Values are mean ± SD and represent the mean of three determinations.

Significant differences between diabetic rats and their corresponding controls are as follows: <sup>a</sup>*P* < 0.05.

Significant differences between cyanide-free cassava diets and standard diet fed animals are as follows: <sup>b</sup>*P* < 0.05.

Day 8 and day 12 correspond to the 8th and 12th day of the first injection of streptozotocin respectively.

control and diabetic rats were selected and the blood samples collected for determining plasma glucose concentrations, by cutting off the tip of tail and squeezing it gently. All diabetic animals included in the study had a fasting blood glucose above 5.55 mm on two occasions (Table II).

Animals were then anaesthetized with pentobarbital (60 mg/kg body weight) and bled from abdominal aorta in a heparinized tube. Plasma was obtained by low-speed centrifugation (1000 *g* × 20 min) and immediately used for vitamin C determinations. After removal of plasma, erythrocytes were washed three times with two volumes of isotonic saline solution. Erythrocytes were lysed with cold distilled water (1/4), stored in refrigerator at 4 °C for 15 min and the cell debris was removed by centrifugation (2000 *g* × 15 min). Erythrocyte lysates were assayed for antioxidant enzyme activities.

#### Determination of plasma glucose and insulin levels

In order to characterize the diabetic state in these animals, glycaemia was measured at third and seventh day after the last injection of STZ, i.e. on day 8 and day 12, by One Touch ULTRA ®Glucometer (LifeScan, Johnson and Johnson, Milpitas, CA, USA). Plasma insulin levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (LINCO Research Inc., St. Louis, MO, USA), according to the manufacturer's instructions.

#### Determination of plasma vitamin C levels

Vitamin C levels were determined in plasma by using the method of Roe and Kuether [18]. After protein precipi-

tation with 10% trichloroacetic acid and centrifugation, the supernatant (500 µL) was mixed with 100 µL of DTC reagent (9 N sulphuric acid containing 2,4-dinitrophenylhydrazine 3%, thiourea 0.4% and copper sulphate 0.05%) and incubated at 37 °C for 3 h. After the addition of 750 µL of 65% (v/v) sulphuric acid, the absorbency was recorded at 520 nm.

#### Determination of erythrocyte antioxidant enzyme activities

Glutathione peroxidase (GSH-Px EC 1.11.1.9) was assessed by the method, as described elsewhere [19], using cumene hydroperoxide as the substrate. One unit of GSH-Px activity is defined as the amount of enzyme which gives a 90% decrease in glutathione concentration per minute at 1 mM glutathione concentration. Glutathione reductase (GSSG-Red EC 1.6.4.2) activity was determined by measuring the rate of NADPH oxidation in the presence of oxidized glutathione [20]. The unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which oxidized 1 mmol of NADPH per minute. Superoxide dismutase (SOD EC 1.15.1.1) activity was measured by the NADPH oxidation procedure [21] and expressed as units of SOD per gram haemoglobin.

#### Statistical analysis

Values are mean ± SD. Statistical analysis of data was carried out using STATISTICA (version 4.1; Statsoft, Paris, France). Data were evaluated by analysis of variance. Duncan's multiple-range test was employed for the comparison between diabetic and control animals, or

between standard diet groups and CFC diet groups. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

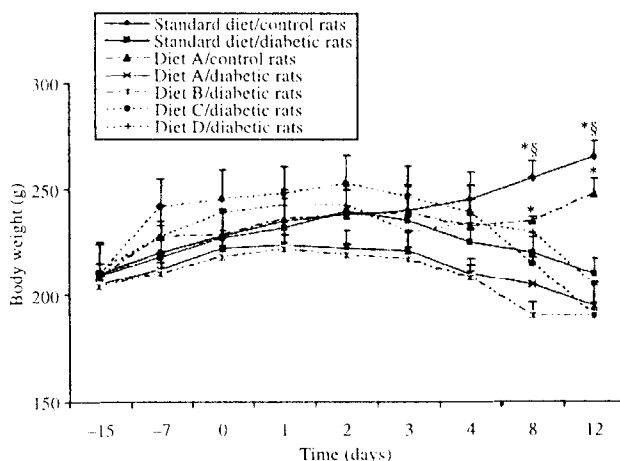
## RESULTS

### Evolution of the body weight of animals

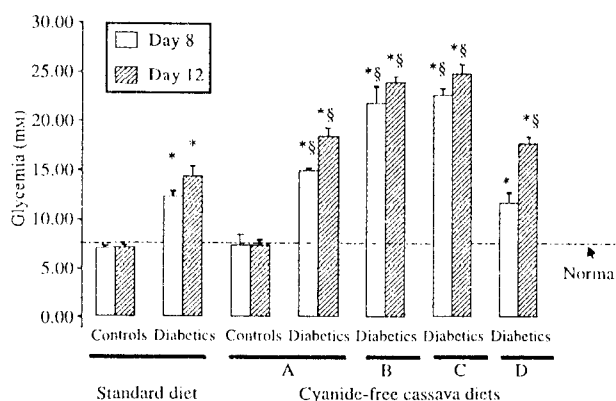
There was no change in the body weight between animals fed CFC diets and those fed standard diets, until 3 weeks of the diet feeding. From this date, the body weights of the CFC diet-fed rats were lower than those of the standard diet-fed animals (Figure 1). However, diabetes induced a decrease in the body weights of the rats fed either standard or CFC diets, with the lowest weight recorded when the hyperglycaemia was maximal, i.e. 1 week after the last injection of the streptozotocin.

### Plasma glucose and insulin levels

Compared with standard diet-fed animals, feeding CFC diet (diet A) did not increase glycaemia in control rats (Figure 2). In contrast, all of the diabetic rats fed CFC diets (diets A, B, C and D) exhibited higher glycaemia compared with diabetic animals fed standard diet. Interestingly, the hyperglycaemia was maximal in CFC diets supplemented with exogenous cyanide and without methionine (diets B and C). However, the CFC diet supplemented with both cyanide and methionine (diet D) improved hyperglycaemia in diabetic rats up to the level



**Figure 1** Evolution of the body weight of diabetic and control rats. Animals were weighed throughout the study and were fed diets for 15 days before diabetes induction and throughout the study. Values are mean  $\pm$  SD. Significant differences between diabetic rats and their corresponding controls are indicated as follows: \* $P < 0.05$ . Significant differences between cyanide-free cassava diets and standard diet-fed animals are indicated as follows: § $P < 0.05$ .



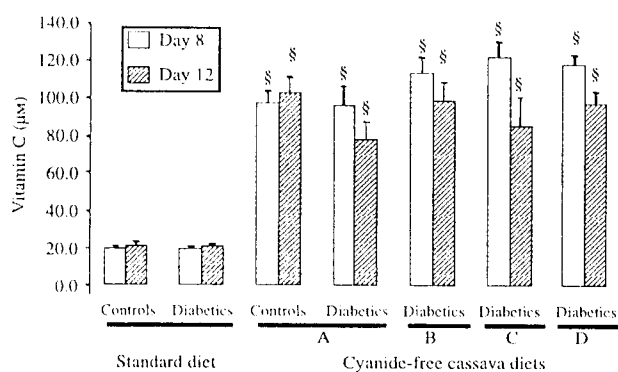
**Figure 2** Plasma glucose concentrations in diabetic and control rats. Glycaemia on day 8 and day 12 in Wistar rats was determined as described in Materials and methods. Each value represents the mean of three determinations. Values are mean  $\pm$  SD. Significant differences between diabetic rats and their corresponding controls are indicated as follows: \* $P < 0.05$ . Significant differences between cyanide-free cassava diets and standard diet-fed animals are indicated as follows: § $P < 0.05$ . Day 8 and day 12 correspond respectively to the 8th and 12th day of the first injection of streptozotocin.

of those fed diet A which contained methionine alone (Figure 2).

Cyanide-free cassava diet did not induce any change in plasma insulin level in control animals, compared with the standard diet-fed control rats. This finding corroborates the results of Mathangi *et al.* [16]. However, all the diabetic rats fed standard or CFC diets exhibited low levels of plasma insulin, compared with their corresponding control animals (Table II). In diabetic rats, the decreases in insulin levels were inversely correlated with the increases in hyperglycaemia. The lowest levels of insulin were observed in diabetic animals fed CFC diets supplemented with exogenous cyanide and without methionine (diets B and C). However, the CFC diet which contained both cyanide and methionine restored the insulin secretion to the levels of rats fed diet A which supplemented with methionine alone (Table II).

### Vitamin C concentrations

All the CFC diets (diets A, B, C and D), containing or not containing methionine with or without cyanide supplementation, induced a significant increase in plasma vitamin C concentrations in both control and diabetic animals, compared with the standard diet-fed rats. Besides, no significant difference was observed in vitamin C levels between control and diabetic rats fed either of the diets (Figure 3).



**Figure 3** Plasma vitamin C concentrations in diabetic and control rats. Plasma vitamin C concentrations were determined as described in Materials and methods. Each value represents the mean of three determinations. Values are mean  $\pm$  SD. Significant differences between cyanide-free cassava diets and standard diet-fed animals are indicated as follows: § $P < 0.05$ . Day 8 and day 12 correspond respectively to the 8th and 12th day of the first injection of streptozotocin.

### Erythrocyte antioxidant enzyme activities

Erythrocyte SOD, GSH-Px and GSSG-Red activities increased in all the CFC diet-fed rats (control and diabetic groups) compared with the standard diet-fed animals (Table III). Besides, in standard diet-fed groups, diabetes induced a decrease in the activities of the three enzymes. On the other hand, feeding CFC diets supplemented with combined cyanide and methionine or methionine alone

(diets A, B and D), induced no significant differences in SOD, GSSG-Red and GSH-Px activities in diabetic and control animals. However, feeding CFC diet supplemented with cyanide alone (diet C) decreased SOD and GSH-Px activities in diabetic rats compared with control animals (Table III).

### DISCUSSION

The role of cassava consumption in the pathogenesis of diabetes mellitus in tropical areas has been studied by several investigators [13,15,16]. The cyanide intoxication has been evoked [7,22,23], as the tuber naturally contains cyanogenic glucosides [1,2]. However, other epidemiological studies did not find any correlation between cassava consumption and prevalence of diabetes mellitus [12,13]. To shed light on these controversial reports, we used, in our study, different kind of diets: standard diet, CFC diet alone or supplemented with exogenous cyanide to mimic naturally occurring cassava. We also added methionine to CFC diet containing cyanide to counterbalance the toxic effect of the latter. These diets were given to control and diabetic rats.

We have observed that, until 3 weeks of diet feeding, the CFC-based diets did not induce any change in the body weight of control animals compared with those fed standard rats. The body weights of the rats fed CFC diets become lower than those of rats fed standard diets. Similar results have been observed by Mathangi et al.

**Table III** Antioxidant enzyme activities in erythrocytes (U/g Hb).

	Standard diet		Cyanide-free cassava (CFC)-based diets				
			Diet A		Diet B	Diet C	Diet D
	Control rats (n = 10)	Diabetic rats (n = 12)	Control rats (n = 10)	Diabetic rats (n = 12)	Diabetic rats (n = 12)	Diabetic rats (n = 12)	Diabetic rats (n = 12)
<b>SOD (U/g Hb)</b>							
Day 8	663.8 $\pm$ 97.4	455.5 $\pm$ 87.6 <sup>a</sup>	1318 $\pm$ 71.8 <sup>b</sup>	1347.7 $\pm$ 71.1 <sup>b</sup>	1358.1 $\pm$ 11.7 <sup>b</sup>	1086.1 $\pm$ 22.8 <sup>ab</sup>	1228.0 $\pm$ 77.7 <sup>b</sup>
Day 12	672.1 $\pm$ 70.3	489.2 $\pm$ 42.2 <sup>a</sup>	1474.5 $\pm$ 98.7 <sup>b</sup>	1403.2 $\pm$ 84.0 <sup>b</sup>	1361.7 $\pm$ 41.1 <sup>b</sup>	1113.5 $\pm$ 97.8 <sup>ab</sup>	1462.0 $\pm$ 61.6 <sup>b</sup>
<b>GSSG-Red (U/g Hb)</b>							
Day 8	41.2 $\pm$ 4.0	30.3 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	134.0 $\pm$ 7.1 <sup>b</sup>	140.6 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	129.3 $\pm$ 9.1 <sup>b</sup>	137.8 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup>	128.9 $\pm$ 5.3 <sup>b</sup>
Day 12	72.2 $\pm$ 4.6	56.5 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	126.3 $\pm$ 10.3 <sup>b</sup>	127.8 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>	139.9 $\pm$ 9.3 <sup>b</sup>	131.9 $\pm$ 12.8 <sup>b</sup>	133.6 $\pm$ 10.2 <sup>b</sup>
<b>GSH-Px (U/g Hb)</b>							
Day 8	92.7 $\pm$ 9.5	63.2 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup>	270.3 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	276.5 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	266.3 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>	235.0 $\pm$ 6.5 <sup>ab</sup>	255.9 $\pm$ 18.1 <sup>b</sup>
Day 12	100.4 $\pm$ 9.3	73.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	199.0 $\pm$ 19.2 <sup>b</sup>	230.1 $\pm$ 19.5 <sup>b</sup>	181.2 $\pm$ 35.1 <sup>b</sup>	126.2 $\pm$ 19.4 <sup>ab</sup>	270.0 $\pm$ 14.2 <sup>b</sup>

Values are mean  $\pm$  SD and represent the mean of three determinations.

Significant differences between diabetic rats and their corresponding controls are as follows: <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

Significant differences between cyanide-free cassava diets and standard diet fed animals are as follows: <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

Day 8 and day 12 correspond respectively to the 8th and 12th day of the first injection of streptozotocin.

SOD, superoxide dismutase; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSSG-Red, glutathione reductase.

[16] who have shown a significant low body weight in rats fed cassava-based diets compared with the control diet-fed animals, from the third month of the study. However, in this study, diabetes induced a decrease in the body weights of the rats fed either standard or CFC diets, with the lowest weight when the hyperglycaemia was maximal, i.e. 1 week after the last injection of the streptozotocin.

In the present study, feeding CFC was not found to induce diabetes in control rats. These results are in accordance with those obtained by several investigators who have demonstrated that long-term consumption of cassava did not produce diabetes in human or rat models [13,16]. However, our results showed that feeding CFC diet, with methionine supplementation (diet A), induced an increased hyperglycaemia in diabetic rats. Moreover, this hyperglycaemia was aggravated when CFC, with/without cyanide supplementation, was consumed in absence of methionine (diets B and C). Our findings are in close agreement with those obtained by Akanji and Famuyiwa [15] who have demonstrated that prolonged cassava intake alone, unassociated with protein malnutrition, caused a significant impairment of glucose tolerance in rats. Similarly, Chibuzo and Ajayi [23] have reported that high consumption of tapioca (cassava) seems to increase diabetic risk with a factor of 3.2 in rats, and in the people of Borno state in Nigeria. Cassava is a natural source of enriched carbohydrates which are metabolized into glucose that increases the hyperglycaemia in diabetic rats fed CFC diets (diets A, B and C) compared with standard diet-fed animals. On the other hand, the increased hyperglycaemia observed in diabetic animals fed CFC diets supplemented or not supplemented with exogenous cyanide may be explained by the fact that the activities of glycogen phosphorylase, glucose-6-phosphatase and phosphoglucomutase increase while those of hexokinase and isocitrate dehydrogenase decrease in the liver of the rats which were fed on cassava low-protein high-cyanide diet [24].

Interestingly, our findings showed that the increased hyperglycaemia observed in diabetic rats fed CFC diets supplemented or not with exogenous cyanide (diets B and C) was improved when these animals were fed CFC diet supplemented with combined cyanide and methionine (diet D) to the level of those of CFC-methionine diet-fed animals (diet A). The improvement of the hyperglycaemia was concomitant with the increase in insulin secretion. Indeed, our results showed that the decreases in insulin levels were inversely correlated with the increases in hyperglycaemia in diabetic animals. The

lowest levels of insulin were observed in diabetic animals fed CFC diets supplemented with exogenous cyanide and without methionine (diets B and C). However, the CFC diet which contained both cyanide and methionine restored the insulin secretion to the levels of rats fed diet A, which was supplemented with methionine alone. Therefore, it appears clear that a high dietary intake of cassava is diabetes-aggravating when cassava progressively causes protein deficiency [15,22,25]. Cassava naturally contains the cyanogenic glycosides which generate cyanhydric acid toxic to the pancreas. Cassava consumption without sufficient protein nutrition leads to massive cyanhydric accumulation which induces pancreatic calcification and impaired insulin secretion. A vigorous cyanide detoxification mechanism uses thiosulphate generated from cysteine contained in methionine as the sulphur source [26]. This may be an explanation for the improvement of the moderate hyperglycaemia observed in the animals fed CFC diet supplemented with combined cyanide and methionine (diet D).

In the present study, the high level of vitamin C, observed in diabetic and control rats which fed either of the CFC diets compared with those of the standard diet-fed groups, was consistent with the hyperglycaemia in these animals, since L-ascorbate (vitamin C) is known to be synthesized from glucose by D-glucuronic acid pathway in lower mammals [27]. On the other hand, the high level of vitamin C may be due to that cassava tuber contains fibre and antioxidant vitamins, such as vitamin C [28].

As far as the antioxidant enzymes are concerned, diabetes induced the decrease in SOD, GSH-Px and GSSG-Red activities in standard diet-fed animals. This observation corroborates our recent findings [14,29] and those of several authors including McLennan *et al.* [30] and Young *et al.* [31] who have demonstrated diminished antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. In contrast, in CFC diet-fed animals, diabetes did not diminish the activities of these enzymes. Moreover, feeding CFC diets, containing or not containing cyanide and supplemented with methionine, compared with the standard diet, enhanced the activities of SOD, GSH-Px and GSSG-Red in both control and diabetic rats. Similar results have been obtained by Boby and Indira [28] who have observed an increased activity of SOD, catalase and GSSG-Red in rats fed on cassava rich diet. However, when CFC diet was supplemented with cyanide alone (without methionine), diabetic rats exhibited a diminished SOD and GSH-Px activities, compared with control rats. This is consistent with the

fact that cyanide is an inhibitor of certain antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase [32–34]. Cyanide is also known as free radical generating agent [35] which inhibits glutathione reductase activity in rodent brain [36]. Moreover, Boby and Indira [28] have also demonstrated that cyanoglycoside-rich fraction from cassava aggravates oxidative stress by reducing the activities of SOD, catalase and GSSG-Red in rats.

## CONCLUSION

Taken together, cassava consumption was not found to induce diabetes mellitus in rats. However, dietary cassava which contains cyanide in the absence of adequate methionine contents appeared to be a diabetes-aggravating factor, as far as hyperglycaemia and oxidative stress are concerned.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to the IDB that granted a scholarship to one of the authors (A. Yessoufou). Thanks are also due to French Embassy at Cotonou, Benin and the French Foreign Office (CMEP) which sanctioned the contingent grants for this work. We also thank Jean-Pierre Dahoué (International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin) who very kindly supplied us with the cassava flour samples.

## REFERENCES

- Nartey E. Studies on cassava *Manihot utilissima* Pohl. cyanogenesis: the biochemistry of linamarin and lotaustralin in etiolated seeding. *Phytochemistry* (1968) **7** 1307–1312.
- Sreeja V.G., Nagahara N., Li Q., Minami M. New aspects in pathogenesis of konzo: neural cell damage directly caused by linamarin contained in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Br. J. Nutr.* (2003) **90** 467–472.
- Delange F., Ahluwalia R. Cassava toxicity and thyroid: research and public health issues. *Int. Dev. Res. Centre Monogr. IDRC* (1983) 207.
- Osuntokun B.O. Cassava diet, chronic cyanide intoxication and neuropathy in the Nigerian Africans. *World Rev. Nutr. Diet* (1981) **36** 141–173.
- Mohan V., Premalatha G., Pitchumoni C.S. Tropical chronic pancreatitis: an update. *J. Clin. Gastroenterol.* (2003) **36** 337–346.
- Petersen J.M. Tropical pancreatitis. *J. Clin. Gastroenterol.* (2002) **35** 61–66.
- WHO. WHO on Diabetes mellitus Report of a WHO Study Group. *Tech. Rep. Ser.* (1985) **727** 20–25.
- Djrolo F., Houngbe H., Avode G. et al. Le diabète lié à la malnutrition (diabète tropical): A propos d'un cas observé en Médecine interne à Cotonou. *Méd. Afrique Noire* (1998) **45** 538–542.
- Akanji A.O. Malnutrition-related diabetes mellitus in young adult diabetic patients attending a Nigerian diabetic clinic. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (1990) **93** 35–38.
- Akanji A.O., Adeyefa L., Charles-Davies M., Osotimehin B.O. Plasma glucose and thiocyanate responses to different mixed cassava meals in non-diabetic Nigerians. *Eur. J. Clin. Nutr.* (1990) **44** 71–77.
- Swai A.B., Mclarty D.G., Mtinangi B.L. et al. Diabetes is not caused by cassava toxicity. A study in a Tanzanian community. *Diabetes Care* (1992) **15** 1378–1385.
- Bhatia E., Choudhuri G., Sikora S.S. et al. Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology* (2002) **123** 1020–1025.
- Schneider A., Suman A., Rossi L. et al. SPINK1/PSTI mutations are associated with tropical pancreatitis and type II diabetes mellitus in Bangladesh. *Gastroenterology* (2002) **123** 1026–1030.
- Yessoufou A., Soulaïmann N., Merzouk S. et al. N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macro-somic offspring. *Int. J. Obes.* (2006) **30** 739–750.
- Akanji A.O., Famuyiwa O.O. The effect of chronic cassava consumption, cyanide intoxication and protein malnutrition on glucose tolerance in growing rats. *Br. J. Nutr.* (1993) **69** 276–279.
- Mathangi D.C., Deepa R., Mohan V., Govindarajan M., Namasivayam A. Longterm ingestion of cassava (tapioca) does not produce diabetes or pancreatitis in the rat model. *Int. J. Pancreatol.* (2000) **27** 203–208.
- Triboulot C., Hichami A., Denys A., Khan N.A. Omega-3 dietary polyunsaturated fatty acids diminish hypertension: implication of T-cell signaling mechanisms. *J. Nutr.* (2001) **131** 2364–2369.
- Roe J.H., Kuether C.A. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.* (1943) **147** 399–407.
- Paglia D.E., Valentine W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* (1967) **70** 158–169.
- Goldberg D.M., Spooner R.J. Glutathione reductase, in: Bergmeyer H.B. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*, vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim, 1992, pp. 258–265.
- Elstner E.F., Youngman R.J., Obwald W. Superoxide dismutase, in: Bergmeyer H.B. (Eds), *Methods of enzymatic analysis*, vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim, 1992, pp. 293–302.
- Rao R.H. The role of under-nutrition in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* (1984) **7** 595–601.
- Chibuzo E.C., Ajayi O.A. Effect of Wainan Rogo on body weight and plasma glucose in Wistar rats. *Nutr. Health* (2000) **14** 133–140.
- Sreeja V.G., Leelamma S. Hyperglycemic effect of low protein cassava diet. *Ind. J. Exp. Biol.* (1998) **36** 308–310.

- 25 Rao R.H. Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? *Endocrine Rev.* (1988) **9**, 67–87.
- 26 McMillan D.E. Tropical malnutrition diabetes. *Diabetologia* (1986) **29** 127–128.
- 27 Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam. Horm. A Rev.* (2001) **61** 241–266.
- 28 Boby R.G., Indira M. The impact of cyanoglycoside rich fraction isolated from cassava (*Manihot esculenta*) on alcohol induced oxidative stress. *Toxicon* (2003) **42** 367–372.
- 29 Yessoufou A., Moutairou K., Girard A. *et al.* Antioxidant status in alcohol-related diabetes mellitus in Beninese subjects. *Cell Mol. Biol.* (2005) **51** 849–858.
- 30 McLennan S.V., Heffernan S., Wright L. *et al.* Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* (1991) **40** 344–348.
- 31 Young I.S., Torney J.J., Trimble E.R. The effects of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Rad. Biol. Med.* (1992) **8** 752–758.
- 32 Sreeja V.G., Leelamma S. Effect of protein supplemented cassava diet in rats. *Ind. J. Biochem. Biophys.* (1996) **33** 149–151.
- 33 Hadas E., Stankiewicz M. Superoxide dismutase and total antioxidant status of larvae and adults of *Trichostrongylus colubriformis*, *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta*. *Parasitol. Res.* (1998) **84** 646–650.
- 34 Ramirez D.C., Gomez Mejiba S.E., Mason R.P. Mechanism of hydrogen peroxide-induced Cu,Zn-superoxide dismutase-centered radical formation as explored by immuno-spin trapping: the role of copper- and carbonate radical anion-mediated oxidations. *Free Radic. Biol. Med.* (2005) **38** 201–214.
- 35 Reiter R.J., Carneiro R.C., Oh C.S. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm. Metab. Res.* (1997) **29** 363–372.
- 36 Tor-Agbidye J., Palmer V.S., Spencer P.S., Craig A.M., Blythe L.L., Sabri M.I. Sodium cyanate alters glutathione homeostasis in rodent brain: relationship to neurodegenerative diseases in protein-deficient malnourished populations in Africa. *Brain Res.* (1999) **820** 12–19.

**Cassava enriched diet is not diabetogenic rather it aggravates diabetes in rats**

Akadiri Yessoufou<sup>a,b</sup>, Jean-Marc Atègbo<sup>c</sup>, Aurélie Girard<sup>a</sup>, Josiane Prost<sup>a</sup>, Karim L. Dramane<sup>c</sup>, Kabirou Moutairou<sup>b</sup>, Aziz Hichami<sup>a</sup>, Naim A. Khan<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>University of Bourgogne, Department of Physiology, UPRES EA 4183 ‘‘Lipids and Cellular Signalling’’, Faculty of Life Sciences, Dijon, France; <sup>b</sup>Laboratory of Cell Biology and Physiology; <sup>c</sup>Laboratory of Pharmacodynamics, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Benin.

**Résumé:**

La consommation chronique du manioc a été évoquée comme jouant un rôle dans la pathogenèse du diabète. Nous avons évalué l’effet de la consommation du manioc (*Manihot esculenta*) qui contient naturellement des glycosides cyanogènes sur la progression du diabète chez le rat. Le diabète a été induit par l’administration de cinq doses modérées de streptozotocine aux rats mâles *wistar* qui ont été soumis à un régime standard ou à un régime riche en farine de manioc du Bénin débarrassé de cyanure (CFC) en présence ou non d’un apport exogène de cyanure avec ou sans la méthionine. La méthionine a été utilisée pour contrebalancer l’effet toxique du cyanure. Au cours de la progression du diabète, nous avons mesuré la glycémie et déterminé le statut antioxydant des rats diabétiques, à travers les concentrations plasmatiques de la vitamine C et les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase (SOD), de la glutathion peroxydase (GSH-Px) et de la glutathion réductase (GSSG-Red).

La consommation du régime CFC n’a pas induit le diabète chez les rats contrôles ; ce régime a plutôt aggravé, chez les animaux diabétiques, l’hyperglycémie dont la sévérité est accrue lorsqu’on ajoute à ce régime CFC, du cyanure exogène. L’addition de la méthionine a significativement diminué l’effet toxique du cyanure ajouté au régime CFC chez les rats diabétiques. Dans le régime standard, les activités enzymatiques de la SOD, de la GSH-Px et de la GSSG-Red étaient plus faibles chez les rats diabétiques que chez les rats contrôles. Curieusement, les concentrations plasmatiques en vitamine C et les activités des enzymes antioxydantes étaient plus élevées chez les rats diabétiques et contrôles nourris au régime CFC contenant ou non du cyanure exogène avec ou sans méthionine, que chez les rats soumis au régime standard. Cependant, les animaux diabétiques soumis au régime CFC ajouté de cyanure avaient des activités enzymatiques de la SOD et de la GSH-Px plus basses que ceux nourris au régime CFC sans cyanure. Notre étude démontre que la consommation du manioc contenant du cyanure est un facteur aggravant du diabète.

**Mots clés :** Toxicité du manioc ; diabète ; statut antioxydant ; rats.



**Publication n°6**

**Malnutrition-modulated diabetes mellitus (MMDM): a state of review**

<sup>1,2</sup>A Yessoufou, <sup>1,3</sup>J.M. Atègbo, <sup>1,2</sup>K. Moutairou, and <sup>1</sup>N. A. Khan

*International Journal of Biological and Clinical Sciences* 2008; (2)2: 230-238

***Objectif de l'étude***

Dans cette revue, nous faisons le point sur le diabète tropical et la malnutrition afin d'aboutir à un consensus sur les caractéristiques cliniques, physiologiques et pathogéniques de cette pathologie

*Title:*

**Malnutrition-modulated diabetes mellitus (MMDM): a state of review**

*Authors:*

<sup>1,2</sup>A Yessoufou, <sup>1,3</sup>**J.M. Atègbo**, <sup>1,2</sup>K. Moutairou, <sup>3</sup>K.L. Dramane, and <sup>1</sup>N. A. Khan

*Authors addresses:*

<sup>1</sup>University of Burgundy, Department of Physiology, UPRES EA 4183 ‘‘Lipids and Cellular Signalling’’, Faculty of Life Sciences, Dijon, France; <sup>2</sup>Laboratory of Cell Biology and Physiology, Department of Biochemistry and Cell Biology, <sup>3</sup>Department of Animal Physiology, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Benin.

*Corresponding author:*

Dr Jean-Marc ATEGBO, Université d’Abomey-Calavi, Faculté des Sciences et Techniques, Département de Physiologie Animale, Bp 526 Cotonou (Bénin). Tél 95 87 78 83/98 11 15 19/93989313. E-mail [jeanmarc.ategbo@univ-abomey-calavi.bj](mailto:jeanmarc.ategbo@univ-abomey-calavi.bj)

## **Abstract**

Diabetes is a worldwide public health problem and is progressively increasing in third world countries, particularly in African subcontinent and southern Asia due to low socio-economic standards. Firstly, malnutrition and undernutrition with cassava consumption and cyanide intoxication have been thought to be the major cause of diabetes in tropical countries with an unusual clinical course. This prompted the WHO Expert Committee on Diabetes to suggest in its report that the relationship between MRDM and high cassava consumption should be defined. However, many recent studies failed to report any association between tropical diabetes and malnutrition. In this paper, we shed light on this form of diabetes in its global clinical and epidemiological features in order to draw a consensus on the statement of the exact clinical, physiological and pathogenic features of this form.

**Key words:** Tropical diabetes, cassava, malnutrition-related diabetes mellitus

## **Introduction**

For a long time, diabetes has been considered as a disease of developing countries. However, in the recent years, it has emerged as a worldwide public health problem, particularly in under-developing tropical countries (Monteiro *et al.*, 1991; Rolfe *et al.*, 1992). In 1997, about 127 millions of diabetic patients were registered all over the world and, till 2010, their number would increase to 221 millions (Amos *et al.*, 1997). In addition, it is believed that, in Africa, diabetes prevalence will be multiplied by a factor of 2 or 3 (Amos *et al.*, 1997).

Although the classical criteria like age of diabetes onset, obesity symptoms, family history of diabetes, urinary ketosis and autoimmunity context allowed the classification of the major types of diabetes (type I and type II) in developing countries (Keen, 1986), a number of patients, based on these criteria, in under-developing tropical countries could not be classified (Ahuja, 1965; West, 1980; Mohan *et al.*, 1992). Alberti (1993) has considered these parameters on the definition of type 2 diabetes relative to the exclusion of other types of diabetes. However, the problem in Africa and South Asia seems to be much more complex since intermediate forms of diabetes have been described in young and adult patients with normal weight and great variability in ketosis and insulin requirement (Ahren, 1985). Indeed,

the term used for the classification of diabetes had considerably changed during the course of time. The first widely accepted classification of diabetes mellitus was published by the World Health Organisation (WHO, 1980) and, in modified form, in 1985 (WHO, 1985). The 1980 and 1985 classifications of diabetes mellitus and allied categories of glucose intolerance included clinical classes and two statistical risk classes. The 1980 WHO Expert Committee proposed two major classes of diabetes mellitus and named them, IDDM or Type 1, and NIDDM or Type 2. In the 1985 WHO Study Group Report, the terms Type 1 and Type 2 were omitted, but the classes IDDM, which main pathogenic factor is malnutrition and NIDDM were retained, and a class of Malnutrition-Related Diabetes Mellitus (MRDM) was introduced. At that time, these particular forms of diabetes in tropical countries have been designated as “tropical diabetes” though its characteristics remain largely unclear (Ahuja, 1965; McMillan *et al.*, 1979; Nwokolo *et al.*, 1980; Rao, 1983). Then, the WHO Study Group (Nwokolo *et al.*, 1980) has proposed that MRDM should be classified as a separate sub-class of diabetes, as up to 80% of the cases of diabetes seen in some tropical countries belong to MRDM (Ekoe, 1985; Abu-Bakare *et al.*, 1986). Various reports have previously tried to define the characteristics of this form of diabetes. It has been suggested that MRDM might be related to malnutrition alone or combination with cassava consumption and cyanide intoxication (Rao, 1983; WHO, 1985; Ekoe, 1985). Cassava, commonly known as tapioca or manihot, is widely cultivated in more than 80 tropical countries and often consumed as a staple diet. It provides a cheap source of high carbohydrates with low protein contents. Cassava is known to contain cyanogenic glycosides, linamarin, and lotaustralin (Nartey, 1968). The hypothesis proposed by McMillan *et al.*, (1980) has linked fibrocalculous pancreatic diabetes (FCPD) to the consumption of cassava. This has been based on the epidemiological overlap between the occurrence of the disease and the areas where the tuber is consumed (e.g., Kerala State in South Western India) though some experimental evidence is also apparent (McMillan *et al.*, 1980; Geldof *et al.*, 1992). However, it still remains unclear whether MRDM should be considered as a distinct clinical entity, though many epidemiological studies have failed to establish unequivocally the correlation ship between its prevalence and cassava consumption or protein malnutrition (Abu-Bakare *et al.*, 1986; Teuscher *et al.*, 1987; Akanji, 1990, 1990). Swai *et al.* (1992) in Tanzania and Teuscher *et al.* (1987) in West Africa have not found any incidence of diabetes in a population who had high consumption of cassava or dietary cyanide.

In 1999 as per WHO recommendations, the terms IDDM and NIDDM were replaced by Type 1 and Type 2. For the MRDM, the malnutrition reason or protein deficiency appears not to be convincing. Therefore, the class of MRDM is asked to be suppressed. The WHO acknowledged the term of Malnutrition-Modulated Diabetes Mellitus (MMDM) for which more studies are needed. The other subtype of MRDM, Fibrocalculous Pancreatic Diabetes (FCPD), is now classified as a disease of the exocrine pancreas, fibrocalculous pancreatopathy, which may lead to diabetes mellitus.

The purpose of this article is, therefore, to make a review of the literature in order to obtain a consensus on the exact clinical, physiological and etiopathological features of MMDM.

## **Results and discussion**

### **I. Are the C-peptide levels implicated in MMDM?**

Tropical diabetes is a clinical and biological heterogeneous syndrome in relation to insulin secretion (Mohan *et al.*, 1985; Sobngwi *et al.*, 2002). When MMDM is insulin-dependent with urinary ketosis and without insulin therapy, the C-peptide level is very low on fasting or after glucose ingestion. But when tropical diabetes is insulin-requiring, without urinary ketosis, the C-peptide concentration is intermediary. In the case of MMDM non insulin-dependent, in which oral treatment is favourable, the C-peptide level remains low but appreciable. It appears clearly that, therapeutically, MMDM can acquire the form of insulin-dependent diabetes (type 1) or the form of non insulin-dependent diabetes (type 2) or an intermediary form which is insulin-requiring diabetes. Indeed, Yajnik *et al.* (1990) have observed that the diminution of beta-pancreatic cell function is similar in tropical diabetes and type 1 diabetes. However, the alteration in beta-cell function is partially reversible after insulin therapy in tropical diabetes while it is not in the case of type 1 diabetes.

Nonetheless, this kind of diabetes has been considered to be the result of insulinopenia, low insulin reserve and diminished sensitivity to insulin. All reports are unanimous on the low levels of insulin and C-peptide during fasting and in response to glucose or glucagons. Values are substantially lower than in normal, but higher than those in

insulin-dependent diabetes mellitus. These findings suggest persistence of some residual  $\beta$ -cell function for many years after the onset of the pathology.

## **II. Is cassava implicated in MMDM?**

The National Diabetes Data Group (1979) and the WHO Expert Committee on diabetes (1980) acknowledged the malnutrition as a putative aetiological factor in the pathogenesis of certain forms of diabetes. Several investigators have observed in patients with tropical diabetes, the history of malnutrition during childhood (Nwokolo *et al.*, 1980; Abu-Bakare *et al.*, 1986; Djrolo *et al.*, 1998). These patients were from the poorest socio-economic strata of the rural sector of central Africa. Dietary calculations revealed low intake of total calories (62%), carbohydrate (72%), protein (56%) and fat (53%) as compared with recommended allowances before the onset of diabetes (Huh *et al.*, 1992). Clinical (Smith *et al.*, 1975; Balasse *et al.*, 1992) and experimental studies (Okitotonda *et al.*, 1987, 1988) have shown that protein malnutrition and fasting are associated with the alteration of glucose homeostasis (Figure 1). Moreover, the diet toxic agents like cassava derivatives, quietly carbohydrate rich-diet, have been evoked in the genesis of tropical diabetes (McMillan *et al.*, 1979; McMillan, 1986). Indeed, high consumption of cassava or its derivatives is generally correlated with high prevalence of tropical diabetes (McMillan *et al.*, 1979; Nwokolo *et al.*, 1980). In contrast, Swai *et al.* (1992) have reported that high dietary cyanide exposure was not found to have had a significant effect on the prevalence of diabetes in an undernourished population in two rural communities in Tanzania. Cassava consumption is thus highly unlikely to be a major etiological factor in so-called MRDM, at least in East Africa. Teuscher *et al.* (1997) have found no diabetes incidence in a population in West Africa who had high consumption of cassava. Similarly, Mathangi *et al.* (2000) have not observed any diabetes in rats fed, for one year, on a cassava rich-diet. Nevertheless, the high consumption of tapioca (cassava) seems to increase diabetic risk with a factor of 3.2 in rats, and in the people of Borno state in Nigeria (Chibuzo *et al.*, 2000). Finally, it appears that a high dietary uptake of cassava is “diabetes-generating” when cassava is progressively causes protein deficiency (Rao, 1983, 1988; Akanji *et al.*, 1993). Cassava contains the cyanogenic glycosides which generate cyanhydric acid which is toxic to the pancreas. The detoxification of these compounds needs sulphur amino-acids. The cassava consumption without sufficient protein nutrition (Table 1) leads to massive cyanhydric accumulation which induces pancreatic calcification and then diabetes. We have also recently observed that cassava consumption did

not induce diabetes but had increased the diabetes potency in rats (unpublished results). In other words, cassava consumption appears as a diabetes-aggravating factor. The high level of vitamin C (Figure 2) observed in diabetic and control rats which fed either of the cassava-based diets compared with those of the standard diet-fed groups, was consistent with the hyperglycaemia in these animals, since L-ascorbate (vitamin C) is known to be synthesized from glucose, by D-glucuronic acid pathway in lower mammals. On the other hand, the high level of vitamin C may be due to that cassava tuber contains fibre and antioxidant vitamins, such as vitamin C (Yessoufou *et al.*, 2006). Taking into account the clinical and experimental data available by 1999, the WHO Study Group acknowledged the current classification: MMDM to designate the three subtypes of diabetes, i.e. MRDM, PDDM or PDPD and the other subtype as Fibrocalculous pancreatic diabetes (FCPD).

### **III. Malnutrition-Modulated Diabetes Mellitus (MMDM)**

#### **a. Clinical characteristics**

The general clinical features of the patients with this form of diabetes are similar in different parts of the world, i.e. India, Bangladesh (South East Asia) and Ethiopia (East Africa). Several months or years after the onset of symptoms of polyuria and polydipsia, these patients consult clinicians and show severe weakness, wasting, cramping abdominal pain and skin infections. The following characteristics have been accepted as typical for MMDM (Djrolo *et al.*, 1998; Tandon *et al.*, 2004):

- History of malnutrition or inadequate nutrition in early childhood and at the onset, probable maternal under-nutrition during pregnancy;
- Rural origin and poor socioeconomic conditions;
- Onset of diabetes usually by 30 years old;
- Body mass index (BMI) < 18 kg/m<sup>2</sup>;
- Severe diabetes with fasting plasma glucose > 200 mg/dl (11.1 mmol/l);
- No tendency to develop urine ketosis at diagnosis even when insulin therapy is interrupted for a long time;
- High insulin requirements for glycaemia control, over 60 UI/ day (2.0 U/kg day);
- Residual secretion of insulin and non-declining of C-peptide level during the disease;

- Absence of radiographic or sonographic evidence of pancreatic calculi, and absence of laboratory findings suggestive of exocrine pancreatic dysfunction;
- Male preponderance.

This form of diabetes constitutes 5.2% of the patients seen at the Diabetes Clinic at Cuttack (Tripathy *et al.*, 1997) compared to 6.2% reported from Korea (Huh *et al.*, 1992). Among patients with onset of diabetes by 30 years of age, 53% were diagnosed as MRDM, considered today as MMDM, at Cuttack (Tripathy *et al.*, 1993) compared to 36% at Dhaka, Bangladesh (Azad-Khan *et al.*, 1991).

## **b. Autopsy and Genetics**

Pancreatic pathology is characterised by reduced size of the pancreas. In microscopical observations, acinar cells are normal in appearance and islets of Langerhans appear reduced in number, though normal in size, morphology and distribution of cell types. There is no evidence of inflammation or fibrosis. These findings are quite different from those in FCPD and in many respects from insulin-dependent diabetes mellitus (Tandon *et al.*, 2004).

Islet cell antibodies (ICA) were detected in 3 of 30 patients (10%) observed in Ethiopia (Abdul-Kadir *et al.*, 1989), 11 of 22 (50%) in Korea (Huh *et al.*, 1992) and one case from Indonesia (Wiyono *et al.*, 1989). Two of 9 patients (22%) in Cuttack were positive for ICA (Tripathy *et al.*, 1997).

GAD antibodies were positive in 9 out of 52 Cuttack patients (17%) with MMDM compared with 2% in healthy controls. The frequency of positivity was not influenced by the duration of the disease.

The HLA pattern of 30 patients in Ethiopia indicated a high frequency of DR3 similar to patients with Type 1 (Tripathy, 1976), while DR4 was found to be more common among those studied in Korea (Huh *et al.*, 1992). On other hand, Sanjeevi *et al.*, (1992) did not find any similarity in the genetic make-up of patients of MMDM and Type 1 from a centre in South India.

## **IV. Fibrocalculous pancreatic diabetes (FCPD)**

### **a. Clinical characteristics**

The majority of patients with this form of diabetes are between 15 and 35 years old.



FPCPD is endemic and unique to developing countries in tropical regions in Asia and Africa (Mohan *et al.*, 1988, 1995). The cause of FPCPD is obscure. Presenting symptoms are those classical for diabetes in the young. Most of patients with FPCPD seeking gastroenterology care have recurrent abdominal pain and indigestion with or without steatorrhea. There could be some admixture of what designated as tropical calcific pancreatitis (TCP) and idiopathic chronic pancreatitis. Further pancreatic calculi and diabetes (90%) are far more common in TCP compared to idiopathic or alcoholic types (Tripathy *et al.*, 1987). The presence of calculi, invariably intraductal and gross dilation of ducts (4-18 mm) are the characteristics. The size of pancreas varies, but it is usually shrunken with irregular margins and increased echogenicity. Evidence of exocrine dysfunction can be elucidated from increase in faecal fat, low faecal chymotrypsin, reduced *N*-benzoyl *L*-tyrosyl *para*-amino benzoic acid (NBT-PABA) excretion and low bicarbonate and lipase levels in duodenal contents in response to evocative tests (Tripathy *et al.*, 1993; Tandon *et al.*, 2004).

The suggested criteria for diagnosis of the condition of FPCPD are similar with those of MMDM, but some differences deserve to be noticed as indicated here-below in italics (Mohan *et al.*, 1995; Djrolo *et al.*, 1998):

- *Occurrence in tropical country;*
- *Diabetes by WHO Study Group criteria;*
- History of malnutrition or inadequate nutrition in early childhood and at the onset, and probable maternal under-nutrition during pregnancy;
- Rural origin and poor socioeconomic conditions;
- Onset of diabetes *usually by 15 – 35 years old;*
- Body mass index (BMI) < 18 kg/m<sup>2</sup>;
- *Diabetes with moderately severe hyperglycaemia for which moderate insulin is needed for glycaemia control in the majority;*
- Residual secretion of insulin;
- *C-peptide levels, fasting and in response to glucose and glucagons, are significantly below normal but higher than that observed in IDDM (Mohan *et al.*, 1985; Sandhyamani *et al.*, 1994)*
- *Ketonuria is rare but occurs in 10-15% at some stages;*
- Male out-number female in most series;

- *Evidence of chronic pancreatic disease, pancreatic calculi in X-ray or in three of the following conditions:*
  - *Abnormal pancreatic morphology with ductal dilatation detected sonography;*
  - *Exocrine pancreas dysfunction tests;*
  - *Chronic recurrent abdominal pain since childhood;*
  - *Steatorrhoea.*
- *Absence of other causes of chronic pancreatitis, i.e. alcoholism hepatobiliary disorder or hyperparathyroidism, etc.*

The majority of patients are most often undernourished with history of low-protein and high-carbohydrate diet. Indeed, experimental data on rhesus and bonnet monkeys have suggested that a low-protein, high-starch diet, whether of cassava of any origin, for several months, can induce changes in pancreas similar to those seen in FCPD (Lokrou *et al.*, 1987). Moreover, Mathangi *et al.* (2000) have observed a significant decrease in serum insulin levels in rats feeding cassava for 6 months and whose diets were composed 75% of cassava, compared to the diet of control animals, even if this decrease was transient as the insulin levels increased to normal after one year of cassava diet. Though a proportion of typical cases are normally nourished, a pathogenic role of deficiency of specific amino-acids or micronutrients and excessive free radical stress cannot be ruled out in areas where cassava consumption is unknown.

## **b. Autopsy and genetics**

Some recent studies evoked a genetic basis and SPINK-1 mutation in FCPD (Lokrou *et al.*, 1987; Sanjeevi *et al.*, 1992). Schneider *et al.* (2002) have found in Bangladesh that the SPINK-1 N34S mutation increases the risk of several form of pancreatic disease, SPINK-1 mutations appeared in 12 of 22 patients (54.55%) with fibrocalculous pancreatic diabetes, 3 of 15 patients (20%) with tropical calcific pancreatitis, 6 of 43 patients (13.95%) with Type 2 diabetes mellitus and 1 of 76 (1.32%) control subjects. Pancreatic morphology has been reported from two endemic areas of South India (Tandon *et al.*, 2004); hence, changes vary from total atrophy of acinar tissue (only a fibrous sack of calculi and secretion within the dilated ductal system) to partially arrested disease affecting certain portions of the gland. Islets appear intact for long periods, although surrounded by fibrous tissue and somewhat reduced in number.

The process appears to be degenerative in nature. Infiltration of a few round cells, observed at certain stages of the disease, do not appear to signify inflammation as a primary mechanism in destruction of the acinar tissue or ductal walls.

## **V. Complications during MMDM**

The peripheral neuropathy, frequent during MMDM (Djrolo *et al.*, 1998; Abbas *et al.*, 2001), is related to the amyotrophic and functional impotency which stimulated the neuropathy in Beninese subjects (Djrolo *et al.*, 1998). In Ivory Coast, 70% of diabetic patients contracted the neuropathy (Gill *et al.*, 1998). The particular frequency of the neuropathy is probably related to the nutritional factors (Djrolo *et al.*, 1998).

The limb infection is particularly important, serious and frequent (Mohan *et al.*, 1985). Some authors have considered that the member infection was specifically tropical, in contrast to the observations in the West (Mohan *et al.*, 1987). Degenerative complications could be observed in tropical diabetes with lower prevalence than that observed in type 2 diabetes (Abbas *et al.*, 2001). The diabetic retinopathy may be prevalent (Clauson *et al.*, 1995; Chaturvedi *et al.*, 1995); however, the macroangiopathy would be rare.

## **VI. State of a consensus view**

It is well recognized that some patients with diabetes mellitus in tropical regions and in some developing countries present other forms of Type 1 and Type 2 diabetes, different from those of Western world and developed countries. In 1985, the WHO Study Group acknowledged this by recognizing a third class of diabetes, designated as MRDM and subdivided into PDDM and FCPD. Since then, more information has been obtained about diabetes in tropical areas and should serve as the basis for further investigations into aetiological, epidemiological and clinical factors of such diabetes. Whilst it appears that malnutrition may influence the expression of several types of diabetes, the evidence that diabetes can be caused by malnutrition or protein deficiency *per se* is not convincing. Therefore, it is recommended that the class "Malnutrition-related diabetes mellitus (MRDM)" be deleted. The former subtype of MRDM, Protein-deficient pancreatic diabetes (PDPD) or Protein-deficient Diabetes Mellitus (PDDM), may be considered as a Malnutrition-Modulated Diabetes Mellitus for which more studies are needed. The other subtype, Fibrocalculous

Pancreatic Diabetes (FCPD), is now classified as a disease of the exocrine pancreas, fibrocalculous pancreatopathy, predisposing genetic, which may lead to diabetes mellitus.

All cases of diabetes can be divided into Type 1 and Type 2 according to their current clinical and metabolic state. Although uncommon in many parts of the world, Type 2 does occur in subjects with low body weight (BMI < 18.5 kg/m<sup>2</sup>). About 80% of patients with Type 2 are obese; however, lack of obesity in some patients has been acknowledged by the WHO Expert Committee on Diabetes (1980) that has recognized two sub-classes: non-obese Type 2 (with low body weight) and obese Type 2. Most observations on non-obese Type 2 reported from the West deal with patients with a mean BMI about 24 kg/m<sup>2</sup> (Hanson *et al.*, 1995; Bell *et al.*, 1996) and greater familial aggregation of non-obese Type 2 has been noticed by several authors (De Joysa, 1951; Ibrahim, 1962). A large number of patients with Type 2 in some tropical countries are very thin and lean with a BMI < 19 kg/m<sup>2</sup> (Schneider *et al.*, 2002; Bhatia *et al.*, 2002).

The consensus, therefore, is as follows:

- a) Malnutrition-Modulated Diabetes Mellitus (MMDM) can be used in place of Malnutrition-Related Diabetes Mellitus (MRDM), Protein-Deficient Diabetes Mellitus (PDDM) or Protein-Deficient Pancreatic Diabetes (PDPD).
- b) Fibrocalculous Pancreatic Diabetes (FCPD) is now classified as a disease of the exocrine pancreas, fibrocalculous pancreatopathy, which may lead to a specific form of diabetes mellitus, clinically either Type 2 or, less frequently, Type 1.

The Type 2 divided into two sub-classes: non-obese Type 2 or “lean Type 2” (with low body weight) and obese Type 2. In some developing countries, non-obese patients constitute a common category and, a proportion of them have BMI less than 18.5 kg/m<sup>2</sup>.

## **Conclusion**

This review reports that the form of tropical diabetes named formerly as MRDM is exceptional in tropical Africa, as previously observed in other countries. The rarity of the cases of MRDM and the lack of systematic association between malnutrition and this form of diabetes lead to consider the classification regarding diabetes in tropical regions. Following

the International Workshop of Cuttack, India, and the Report of WHO Consultation (Geneva 1999), the delegates of several developing countries recommended replacing the term MRDM by MMDM, Malnutrition-Modulated Diabetes Mellitus. FCPD, a form not common in West Africa, but prevalent in other tropical populations, was considered as a separate form. Moreover, there are many factors which are not well understood in the subjects with Type 2 diabetes like low body weight; hence, further researches are required to advance our knowledge on the subject.

## **Acknowledgements**

We express our sincere thanks to the French Embassy at Cotonou, Benin, and the Office of Scholarship Programme of IDB that granted a scholarship to one of the authors (A. Yessoufou). Thanks are due to the Ministry of Higher Education, Republic of Benin, which granted a scholarship to JM. Ategbo.

## **References**

1. Abbas, Z.G., J. Lutale, G.V. Gill and L.K. Archibald, 2001. Tropical diabetic hand syndrome: risk factors in an adult diabetes population. *Int J Infect Dis*, 5: 19-23.
2. Abdul-Kadir, J., Y. Worku, G.M.T. Schreuder, J. D'Amaro, R.R.P. de Vries and T.H.M. Ottenhoff, 1989. HLA-DR-DQ antigens in malnutrition-related diabetes mellitus in Ethiopians a clue to its aetiology. *Tissue Antigens*, 34: 284-289.
3. Abu-Bakare, A., V. Gill, R. Taylor and K.G.M.M. Alberti, 1986. Tropical or malnutrition-related diabetes: a real syndrome? *Lancet*, 1: 1137-1138.
4. Ahren, B., and C.B. Corrigan, 1985. Intermittent need for insulin in a subgroup of diabetic patients in Tanzania. *Diabetic Med*, 2: 262-264.
5. Ahuja, M.M.S., 1965. Ketosis-resistant young diabetics. *Lancet*, VI: 1224-1225.
6. Akanji, A.O., 1990. Malnutrition-related diabetes mellitus in young adult diabetic patients attending a Nigerian diabetic clinic. *Am J Tropical Med Hygiene*, 93: 35-38.

7. Akanji, A.O., and O.O. Famuyiwa, 1993. The effect of chronic cassava consumption, cyanide intoxication and protein malnutrition on glucose tolerance in growing rats. *Br J Nutr*, 69: 276-279.
8. Akanji, A.O., I. Adeyefa, M. Charles-Davies and B.O. Osotimehin, 1990. Plasma glucose and thiocyanate responses to different mixed cassava meals in non-diabetic Nigerians. *Eur J Clin Nutr*, 44: 71-77.
9. Alberti, K.G.M.M., 1993. Problems related to definitions and epidemiology of Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: studies throughout the world. *Diabetologia*, 6: 978-984.
10. Amos, A.F., D.J. McCarty and P. Zimmet, 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med*, 14 (suppl. 5): S1-85.
11. Azad-Khan, A.K., N.G. Banik and H. Mahtab, 1991. Malnutrition-related diabetes mellitus in Bangladesh. In *Diabetes Excerpta Medica*, ICS 1000, Rifkin H, Coldwell JA and Taylor SI, Edn Elsevier, Amsterdam, pp. 944-949.
12. Balasse, E.O., and F. Fery, 1992. Physiopathologie du diabète de famine. In *Journée de diabétologie Hôtel Dieu*, Flammarion Médecine Science, (Paris), pp. 87-99.
13. Bell, J.I., and T.D.R. Hockaday, 1996. Diabetes mellitus. In *Oxford Text Book of Medicine 3<sup>rd</sup> Edn*, Vol. 2, J.D. Weatherall, J.G.G. Ledingham, and D.A. Warrall, Edn. Oxford Medical Publications, Oxford, pp. 1451.
14. Bhatia, E., G. Choudhuri, S.S. Sikora, O. Landt, A. Kage, M. Becker and H. Witt, 2002. Tropical calcific pancreatitis: strong association with SPINK1 trypsin inhibitor mutations. *Gastroenterology*, 123: 1020-1025.
15. Chaturvedi, N., and J.H. Fuller, 1995. Mortality risk by body weight and weight change in people with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The WHO Multifunctional Study Group. *Diabetes Care*, 18: 766-774.

16. Chibuzo, E.C., and O.A. Ajayi, 2000. Effect of Wainan Rogo on body weight and plasma glucose in Wistar rats. *Nutr Health*, 14: 133-140.
17. Clauson, P.G., and B. Linde, 1995. Absorption of rapid acting insulin in obese and non-obese patients. *Diabetes Care*, 18: 986-991.
18. De Joysa, V.P., 1951. Clinical variations of the diabetes syndrome in a tropical country (Ceylon). *Arche Int Med*, 88: 812-818.
19. Djrolo, F., H. Hougbe, G. Avode, V. Attolou, B. Addra, N. Kodjoh, M. Avimadje, B. Monteiro, Th. Zohoun and A. Hountondji, 1998. Le diabète lié à la malnutrition (diabète tropical): A propos d'un cas observé en Médecine interne à Cotonou. *Méd. Afrique Noire*, 45: 538-542.
20. Ekoe, J.M., 1985. Diabetes and nutrition in developing countries. *Bull Deliv Health Care Diabetics Developing Count*, 6: 3-9.
21. Geldof, A.A., J. Becking, C.D. DeVries and E.A. Vander Veen, 1992. Histopathological changes in rat's pancreas after fasting and cassava feeding. *In Vivo*, 6: 545-555.
22. Gill, G.V., O.O. Famuyiwa, M. Rolfe and L.K. Archibald, 1998. Serious hand sepsis and diabetes mellitus: specific tropical syndrome with western counterparts. *Diabet Med*, 15: 858-862.
23. Hanson, R.L., D.J. Pettitt, P.H. Bennett, K.M. Narayan, R. Fernandez, M. de Courten and W.C. Knowler, 1995. Familial relationship between obesity and NIDDM. *Diabetes*, 44: 418-422.
24. Huh, K.B., H.C. Lee, H.M. Kim, Y.W. Cho, Y.L. Kim, K.W. Lee, E.J. Lee, S.K. Lim, D.H. Kim and J.W. Yoon, 1992. Immunogenetic and nutritional profile in insulin using youth onset diabetic in Korea. *Diabet Res Clin Prat*, 16: 63-70.
25. Ibrahim, M., 1962. Diabetes in East Pakistan. *Br Med J*, 1: 837-839.

26. Keen, H., 1986. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. World Book Diabet Pract Elsevier Science publisher, 2: 8-15.
27. Lokrou, A., T. Toutou, Y. Ouedraogo, N. Grogba Bada, A. Koutouan and A. Diallo, 1987. Complication du diabète sucré en milieu hospitalier en Côte d'Ivoire. Med Afr Noire, 34: 593-602.
28. Mathangi, D.C., R. Deepa, V. Mohan, M. Govindarajan and A. Namasivayam, 2000. Long-term ingestion of cassava (tapioca) does not produce diabetes or pancreatitis in the rat model. Int J Pancreatol, 27: 203-208.
29. McMillan, D.E., 1986. Tropical malnutrition diabetes. Diabetologia, 29: 127-128.
30. McMillan, D.E., and P.J. Geevarghese, 1979. Dietary Cyanide and Tropical Malnutrition Diabetes. Diabetes Care, 2: 202-208.
31. McMillan, D.E., and P.J. Geevarghese, 1980. Dietary Cyanide and Tropical Malnutrition Diabetes, In Secondary diabetes: the Spectrum of Diabetic Syndromes, Podolsky S, Viswanathan M, Edn., Raven, New York, , pp. 239-248.
32. Mohan, R., B. Rajendran, V. Mohan, A. Ramachandran, M. Viswanathan and E.M. Konher, 1987. Retinopathy in tropical pancreatic diabetes. Diabetes Care 10: 532-533.
33. Mohan, R., K. Rajendran, V. Mohan, A. Ramachandran, M. Viswanathan and E.M.M. Konher, 1985. Retinopathy in tropical pancreatic diabetes. Arch Ophthalmol, 103: 1487-1489.
34. Mohan, V., A. Ramachandran and M. Viswanathan, 1988. Diabetes in the tropics. In K.G.M.M. Alberti and L.P. Kral, Edn, The Diabetes Annual 4, Elsevier, Amsterdam, pp. 46-55.
35. Mohan, V., and C.S. Yajnik, 1995. Fibrocalculous pancreatic diabetes. J Assoc Phys India, 15: 16-23.



36. Mohan, V., and K.G.M.M., Alberti, 1992. Diabetes in the tropics. International. In: K.G.M.M. Alberti, R.A. de Fronzo, H Keen & P. Zimmel Edn. Textbook of Diabetes mellitus. John Wiley & Sons Ltd. pp, 177-196.
37. Mohan, V., R. Mohan, L. Suscheela, G. Bharani, V.K. Mahajan, A. Ramachandran, M. Viswanathan, and E.M. Kohner, 1985. Pancreatic diabetes in South India: heterogeneity in clinical and biochemical profile. *Diabetologia*, 28: 229-232.
38. Mohan, V., R. Mohan, L. Suscheela, G. Bharani, V.K. Mahajan, A. Ramachandran, M. Viswanathan and E.M. Kohne, 1985. Tropical pancreatic diabetes in South India: heterogeneity in clinical and biochemical profile. *Diabetologia*, 28: 229-232.
39. Mohan, V., S.T. Chari and G. Pamelata, 1994. Difference between tropical and alcoholic chronic pancreatitis seen in South India. In *Diabetes, ICS 1100*, Baba S. and Kaneko T, Edn. Elsevier, Amsterdam, 1995, pp. 253-257.
40. Monteiro, B., M. Gninafon and K.J. Amoussou, 1991. Contribution à l'étude épidémiologique du diabète sucré de l'adulte au CNHU de Cotonou. *Méd. Afrique Noire*, 38: 263-269.
41. Nartey, E., 1968. Studies on cassava *Manihot utilissima* Pohl. Cyanogenesis: the biochemistry of linamarin and lotaustrolin in etiolated seeding. *Phytochemistry*, 7: 1307-1312.
42. National Diabetes Data Group (NDDG), 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28: 1039-1057.
43. Nwokolo, C., and J. Oli, 1980. Pathogenesis of juvenile Tropical. Pancreatitis syndrome. *Lancet*, III: 456-459.
44. Okitotonda, W., S.M. Brichard and J.C. Henguin, 1987. Repercussions of chronic protein-calorie malnutrition on glucose homeostasis in the rat. *Diabetologia*, 50: 946-951.

45. Okitotonda, W., S.M. Brichard, A.M. Pottier and J.C. Henguin, 1988. Influence of low and high-protein diets on glucose homeostasis in the rat. *Br J Nutr*, 60: 509-516.
46. Rao, R.H., 1983. The role of under-nutrition in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 7: 595- 601.
47. Rao, R.H., 1988. Diabetes in the undernourished: coincidence or consequence? *Endocrine Rev*, 9: 67-87.
48. Rolfe, M., C.M. Tang, R.W. Walker, E. Bassey and M. George, 1992. Diabetes mellitus in Gambia, West Africa. *Diabet Med*, 9: 484-488.
49. Sandhyamani, S., M. Balaraman and J.S. Bajaj, 1994. Animal modes of malnutrition-related diabetes mellitus in sub-human primates. In 15<sup>th</sup> IDF Congress Abstract, Kobe, pp. 454.
50. Sanjeevi, C.B., V. Seshaiyah, E. Moller and O. Olerup, 1992. Different genetic background for malnutrition-related diabetes and type 1 (Insulin dependent) diabetes mellitus in South Indians. *Diabetologia*, 35: 283-286.
51. Schneider, A., A. Suman, L. Rossi, M.M. Barmada, C. Beglinger, S. Parvin, S. Sattar, L. Ali, A.K. Khan, N. Gyr and D.C. Whitcomb, 2002. SPINK1/PSTI mutations are associated with tropical pancreatitis and type II diabetes mellitus in Bangladesh. *Gastroenterology*, 123: 1026-1030.
52. Smith, S.R., P.J. Edgar, T. Pozefsky, M.K. Chetri and T.E. Prout, 1975. Insulin secretion and glucose tolerance in adults with protein-calorie malnutrition. *Metabolism*, 24: 1073-1084.
53. Sobngwi, E., F. Mauvais-Jarvis, P. Vexiau, J.C. Mbanya and J.F. Gautier, 2002. Diabetes in Africans. Part 2: Ketosis-prone atypical diabetes mellitus. *Diabetes Metab*, 28: 5-12.
54. Swai, A.B., D.G. Mclarty, B.L. Mtinangi, S. Tatala, H.M. Kitange, N. Mlingi, H. Rosling, W.P. Howlett, G.R. Brubaker and K.G. Alberti, 1992. Diabetes is not caused by cassava toxicity. A study in a Tanzanian community. *Diabetes Care*, 15: 1378-1385.

55. Tandon, R.K., and P.K. Garg, 2004. Tropical pancreatitis. *Digestive Disease*, 22: 258-266.
56. Teuscher, T., P. Baillod, J.B. Rosman and A. Teuscher, 1987. Absence of diabetes in a rural West Africa population with a high carbohydrate cassava diet. *Lancet*, IV: 765-768.
57. Tripathy, B.B., 1976. Diabetes in India. Presented at the 9<sup>th</sup> Congress of IDF, New Delhi.
58. Tripathy, B.B., and K.C. Samal, 1987. Chronic calcific pancreatitis with diabetes in young in developing countries. In *Chronic Pancreatitis in India*, Kalakrishnan V, Edn. Indian Society of Pancreatology, Trivandrum, pp. 89-96.
59. Tripathy, B.B., and K.C. Samal, 1993. Protein deficient diabetes mellitus (PDDM) in India. *Int J Diabetes Dev Countries*, 13: 3-13.
60. Tripathy, B.B., and K.C. Samal, 1997. Overview and consensus statement on diabetes in tropical areas. *Diabetes/Metabolism Rev*, 13: 63-67.
61. West, K.M., 1980. Secondary diabetes: the spectrum of the diabetic syndrome. *Diabetes in the tropic*. Raven Press, pp. 249-255.
62. WHO Expert Committee on diabetes mellitus, second report, 1980. WHO Technical Report, Series 646, Geneva.
63. WHO on diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group, 1985. *Tech Rep Ser*, 727: 20-25.
64. Wiyono, P., Y. Morimoto and H. Taniguchi, 1989. The presence of islet cell antibodies in malnutrition-related diabetes mellitus. *Diabetes Rec Clin Pract*, 6: 75-78.
65. Yajnik, C.S., S.V. Kanitkar, K.M. Shelgikar, S.S. Naik, K.G.M.M. Alberti and D. Hockaday, 1990. Pancreatic C-peptide response to oral glucose in fibrocalculous pancreatic diabetes. *Diabetes Care*, 13: 525-527.

Yessoufou, A., J.M. Ategbo, A. Girard, J. Prost, K.L. Dramane, K. Moutairou, A. Hichami and N.A. Khan, 2006. Cassava-enriched diet is not diabetogenic rather it aggravates diabetes in rats. *Fundam Clin Pharmacol.*, 20: 579-586.

### Figure legends

**Figure 1.** Glycaemia on day 8 and day 12 in wistar rats was determined by One Touch II<sup>®</sup> Glucometer (LifeScan, Johnson and Johnson, USA). Values are mean  $\pm$  SD. Significant differences between STZ-induced diabetic rats and their corresponding controls are indicated as follows: \* $p < 0.05$ . Significant difference between Experimental diet and Standard diet is indicated as follows:  $\S p < 0.05$ . Day 8 and day 12 correspond respectively to the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> day of the first injection of streptozotocin.

**Figure 2.** Plasma vitamin C concentrations were determined by using the method of Roe and Kuetther. After protein precipitation with 10% trichloroacetic acid and centrifugation, the supernatant (500 $\mu$ L) was mixed with 100 $\mu$ L of DTC reagent (9 N sulphuric acid containing 2,4-dinitrophenylhydrazine 3%, thiourea 0.4 % and copper sulphate 0.05%) and incubated at 37°C for 3h. After the addition of 750 $\mu$ L of 65% (v/v) sulphuric acid, the absorbency was recorded at 520 nm. Each value represents the mean of three determinations. Values are mean  $\pm$  SD. Significant differences between cyanide-free cassava diets and standard diet-fed animals are indicated as follows:  $\S p < 0.05$ . Day 8 and day 12 correspond respectively to the 8<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> day of the first injection of streptozotocin.

**Table 1.** Composition of standard and cassava-based diets (g/kg of diet)

compositions	Standard diet	Cyanide-free Cassava (CFC) based diets			
		Diet A	Diet B	Diet C	Diet D
Starch	587	85	85	85	85
Tapioca (cassava) <sup>#</sup>		502	505	503.1	500.1
Potassium cyanide <sup>\$</sup>				1.9	1.9
DL-Methionine	3	3			3
Casein	200	200	200	200	200
sucrose	50	50	50	50	50
cellulose	50	50	50	50	50
mineral mix <sup>μ</sup>	40	40	40	40	40
vitamin mix <sup>μ</sup>	20	20	20	20	20
oil Isio-4	50	50	50	50	50
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>

Values are in (g) per (kg) of the diet.

<sup>\$</sup> Cyanide (Prolabo, Normapur®, Paris, France) in sub-lethal dose according to Akanji and Famuyiwa (1993). <sup>μ</sup> Composition, according to Tribulot et al. (2001).

<sup>#</sup> Cassavas were certified cyanide-free by International Institute of Tropical Agriculture (Cotonou, Benin). The chemical composition of the standard diet was as follows (g / kg dry diet): starch, 587; casein, 200; cellulose, 50; sucrose, 50; mineral mix, 40; vitamin mix, 20; DL-methionine (M), 3; vegetable oil-Isio-4 (Lesieur, Neuilly-sur-Seine, France), 50. Total oil represented 5% of the diet. In each diet group, a total of 5 female Wistar rats were rendered diabetic by five low intraperitoneal (ip) injections of streptozotocin (20 mg/kg body weight) in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5, from day1 to day 5. Glycaemia was determined on day8 and day12.

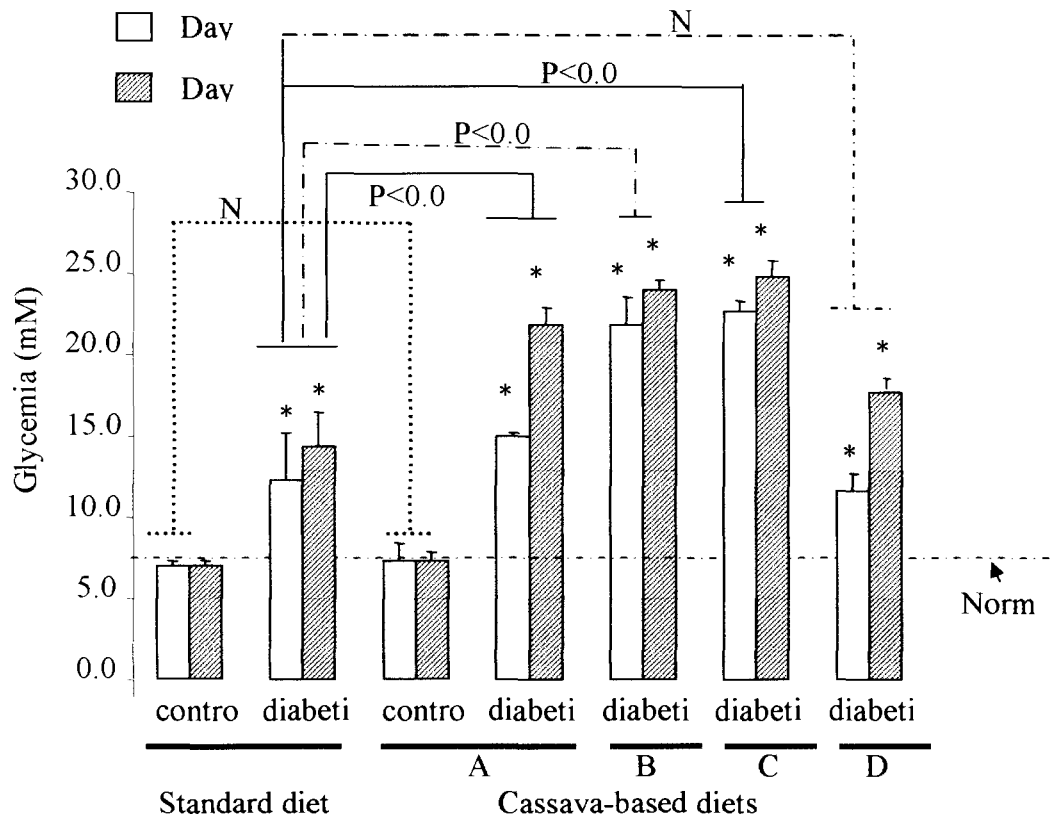


Figure 1: Fasting glycaemia during the induction of diabetes in rats

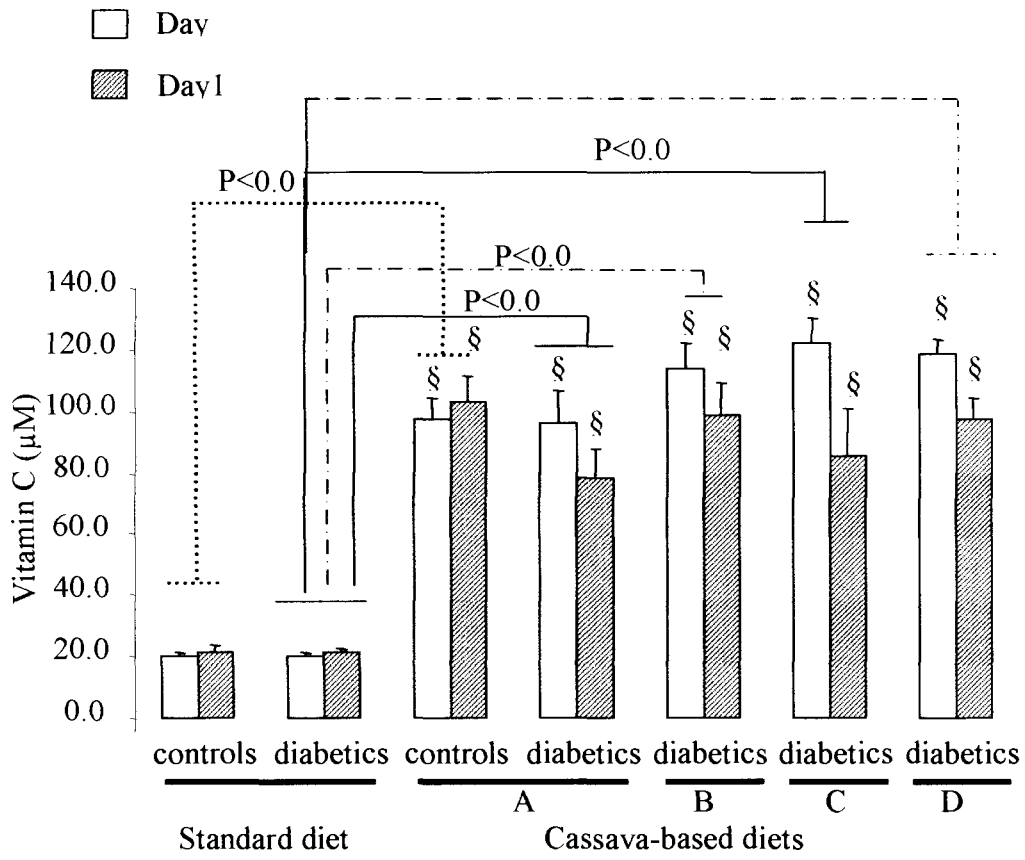


Figure 2: Vitamin C concentrations in diabetic and control rats

<sup>1,2</sup>A Yessoufou, <sup>1,3</sup>J.M. Atègbo, <sup>1,2</sup>K. Moutairou, and <sup>1</sup>N. A. Khan

<sup>1</sup>University of Burgundy, Department of Physiology, UPRES EA 4183 “Lipids and Cellular Signalling”, Faculty of Life Sciences, Dijon, France; <sup>2</sup>Laboratory of Cell Biology and Physiology, Department of Biochemistry and Cell Biology, <sup>3</sup>Department of Animal Physiology, Faculty of Sciences and Techniques, University of Abomey-Calavi, Cotonou, Benin.

**Résumé:**

Le diabète est un problème mondial de santé publique et sa prévalence augmente progressivement dans les pays du Tiers monde, particulièrement dans les sous-continent africain et sud asiatique, du fait de leur faible statut socio-économique. La malnutrition et la sous-alimentation associée à une consommation chronique de manioc et d’intoxication au cyanure ont été évoquées comme étant la cause majeure du diabète dans les pays tropicaux. Ceci a incité le Comité d’Experts de l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur le diabète à suggérer, dans son rapport, que la relation entre le diabète relatif à la malnutrition (MRDM) et une forte consommation de manioc devrait être défini. Cependant, plusieurs études récentes n’ont trouvé aucune association entre le diabète tropical et la malnutrition. Dans cette revue, nous faisons le point sur cette forme de diabète afin d’aboutir à un consensus sur les caractéristiques cliniques, physiologiques et pathogéniques de cette pathologie.

**Mots clés :** Diabète tropical, manioc, diabète relatif à la malnutrition



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adjanohoun EJ, Adjakidje V, Ahyi MRA, Ake Assi L, Akoegninou A, d'Almeida J, Apovo F, Boukef K, Chadare M, Cusset G, Dramane K, Eyme J, Gassita JN, Gbaguidi N, Goudote E, Guinko S, Houngnon P, Issa LO, Keita A, Kiniffô HV, Kone-Bamba D, Musampa Nseyya A, Saadou M, Sodogandji Th, de Souza S, Tchabi A, Zinsou Dossa C, Zohoun Th. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Bénin. *Médecine Traditionnelle et Pharmacopée. Agence de Coopération Culturelle et Technique* 1989, pp 731-732.
2. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 327-332.
3. Ahuja MMS. Ketosis-resistant young diabetics. *Lancet* 1965, VI: 1224-1225.
4. Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ. From adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol* 2006; 329: 570-577.
5. American Diabetes Association Consensus Statement. *Diabetes Care* 1999; 22 (suppl 1): S61-S74.
6. Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA, Grimaldi PA. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem* 1995; 270(5): 2367-2371.
7. Anastasiou E, Lekakis JP, Alevizaki M, Papamichael CM, Megas J, Souvatzoglou A, Stamatelopoulos SF. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 2111-2115.
8. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79-83.
9. Atégbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4137-4143.
10. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001; 34(1): 65-70.
11. Babawale MO, Lovat S, Mayhew TM, Lammiman MJ, James DK, Leach L. Effects of gestational diabetes on junctional adhesion molecules in human term placenta vasculature. *Diabetologia* 2000; 43: 1185-1196.
12. Bach J-F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 1994; 15: 516-520.
13. Bahia L, Aguiar LG, Villela N, Bottino D, Godoy-Matos AF, Geloneze B, Tambascia M, Bouskela E. Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics* 2006; 61: 433-440.

14. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both *in vivo* and *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2084-2089.
15. Bastie C, Holst D, Gaillard D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor PPARdelta promotes induction of PPARgamma and adipocyte differentiation in 3T3C2 fibroblasts. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 21920-21925.
16. Best CH. The first clinical use of insulin. *Diabetes* 1956; 5: 65-67.
17. Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta* 2006; 27(2-3): 327-332.
18. Bis-Gluchowska M, Marciniak B, Szpringer-Bogun E, Rola R, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. [Determination of antioxidative-peroxidative balance in the cord blood of newborns delivered to mothers with diabetes type G1]. *Ginekol Pol* 2001; 72(12A): 1255-1258.
19. Boden G. Fuel metabolism in pregnancy and in gestational diabetes mellitus. *Obst Gyn Clin N Am* 1996; 23: 1-10.
20. Bors W, Heller W, Michel C, Satan M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging-efficiencies. *Methods in Enzymology* 1990; 186: p 343.
21. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 1996; 137: 354-366.
22. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (Suppl): 1256S-1261S.
23. Caimi G, Carollo C, Lo Presti R. Diabetes mellitus: oxidative stress and wine. *Curr Med Res Opin* 2003; 19(7): 581-586.
24. Catalano PM. Carbohydrate metabolism and gestational diabetes. *Clin Obstet Gynecol* 1994; 37: 25-38.
25. Catalano PM, Huston L, Amini SB, Kalhan SC. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 903-916.
26. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J. Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *J Nutr* 2003; 133(5 Suppl 2):1674S-1683S.
27. Cavan D, Bain S, Barnett A. The genetics of type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. *J Med Genetics* 1992; 29: 441-449.

28. Ceriello A, Falletti E, Bortolotti N, Motz E, Cavarape A, Russo A, Gonano F, Bartoli E. Increased circulating intercellular adhesion molecule-1 levels in type II diabetic patients: the possible role of metabolic control and oxidative stress. *Metabolism* 1996; 45: 498-501.
29. Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Ezzol Z, Tonutti L, Taboga C. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and noninsulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 329-333.
30. Chaudhari L, Tandon OP, Vaney N, Agarwal N. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetics. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003; 47(4): 441-446.
31. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001; 7: 48-52.
32. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995; 16(2): 117-142.
33. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273: 25573-80.
34. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 2000; 101: 2411-2417.
35. Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, Kim TS. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 2000; 275: 32681-32687.
36. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance: National Diabetes Data Group. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
37. Clement K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, Sicard A, Rome S, Benis A, Zucker JD, Vidal H, Laville M, Barsh GS, Basdevant A, Stich V, Cancellato R, Langin D. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J* 2004; 18: 1657-1669.
38. Colville-Nash PR, Qureshi SS, Willis D, Willoughby DA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol* 1998; 161: 978-84.
39. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001; 108: 1875-1881.
40. Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 349-356.

41. Cordero L, Landon MB. Infant of the diabetic mother. *Clin Perinatol* 1993; 20(3): 635-648.
42. Coustan DR. Diagnosis of gestational diabetes. Are new criteria needed? *Diabetes Reviews* 1995; 3: 614-620.
43. Coustan DR. Gestational diabetes: a continuum of risk. *Eur J Endocrinol* 1997; 137(1): 13-14.
44. Coustan DR, Carpenter MW. The diagnosis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21 Suppl 2: B5-8.
45. Cowett RM, Schwartz R. The infant of the diabetic mother. *Pediatr Clin North Am* 1982; 29(5): 1213-1231.
46. Creely SJ, McEternan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E740-747.
47. Damm P, Kuhl C, Buschard K, Jakobsen BK, Svejgaard A, Sodoyez-Goffaux F, Shattock M, Bottazzo GF, Molsted-Pedersen L. Prevalence and predictive value of islet-cell antibodies in women with previous gestational diabetes. *Diabetic Med* 1994; 11: 558-563.
48. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 1996; 347: 444-445.
49. Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor Necrosis Factor-alpha in sera of obese patients: Fall with Weight Loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2907-2910.
50. Dandona P, Aljada A, bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25: 4-7.
51. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 2005; 111: 1448-1454.
52. De Fronzo RA, Ferraninni E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-179.
53. Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: *in vivo* and *in vitro* studies. *Endocrinology* 2004; 145: 5589-5597.
54. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 169(3): 453-459. Review.

55. De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Armiento A, Ferri C, Balsano F. Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47: 993-997.
56. Desai M, Crowther NJ, Ozanne SE, Lucas A, Hales CN. Adult glucose and lipid metabolism may be programmed during fetal life. *Biochem Soc Trans* 1995; 23(2): 331-335.
57. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384: 39-43.
58. Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Ghio A, Giovannitti MG, Cucuru I, Pellegrini G, Chatzianagnostou K, Boldrini A, Del Prato S. Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. *Diabet Med* 2005; 22(1): 21-25.
59. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human and possible biological roles. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 293-300.
60. Djrolo F, Megnigbeto Obey A, De Souza J, Takpara I, Santos P, Alihonou E. Influence of maternal weight on pregnancy outcome in Cotonou (Benin). *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2002; 31: 243-247.
61. Djrolo F, Amuossou-Guenou KD, Zannou DM, Houinato D, Ahouandogbo F, Houngbe F. Prévalence du diabète sucré au Bénin. *Louvain Med* 2003; 122: S258-S262.
62. Dorner G, Plagemann A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res* 1994; 26(5): 213-221.
63. Dornhorst A, Paterson CM, Nicholls JSD, Wadsworth J, Chiu DC, Elkeles RS, Johnston DG, Beard RW. High prevalence of gestational diabetes in women from ethnic minority groups. *Diabetic Med* 1992; 9: 820-825.
64. Eckel RH. Insulin resistance: an adaptation for weight maintenance. *Lancet* 1992; 340(8833): 1452-1453.
65. Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, Link AA, Dimitrov MA, Fisher S, Crane M, Kanik KS, Chrousos GP. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(10): 4933-4938.
66. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003; 289: 1799-1804.
67. Ettinger Jr. Wh, Sun Wh, Binkley N, Kouba E, Ershler W. Interleukin-6 causes hypocholesterolemia in middle-aged and old rhesus monkeys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: M137-M140.

68. Evers IM, de Valk HW, Visser GH. Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *BMJ* 2004; 328(7445): 915-920.
69. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 911-918.
70. Fernandez-Real JM, Lopez-Bermejo A, Casamitjana R, Ricart W. Novel interactions of adiponectin with the endocrine system and inflammatory parameters. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 88: 2714-2718.
71. Fernandez-Real JM, Vendrell J, Ricart W, Broch M, Gutierrez C, Casamitjana R, Oriola J, Richart C. Polymorphism of the tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor 2 gene is associated with obesity, leptin levels, and insulin resistance in young subjects and diet-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000; 23: 831-837.
72. Festa A, Shnawa N, Krugluger W, Hopmeier P, Scherthaner G, Haffner SM. Relative hypoleptinaemia in women with mild gestational diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16(8): 656-662.
73. Fowden AL. The role of insulin in prenatal growth. *J Dev Physiol* 1989; 12(4): 173-182
74. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 847-850.
75. Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T, Catalano P. Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1807-1814.
76. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(4): 2005-2010.
77. Frystyk J, Nyholm B, Skjaerbaek C, Baxter RC, Schmitz O, Orskov H. The circulating IGF system and its relationship with 24-h glucose regulation and insulin sensitivity in healthy subjects. *Clin Endocrinol* 2003; 58: 777-784.
78. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, Arita Y, Kihara S, Matsuzawa Y. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med* 1999; 38(2): 202-206.
79. Gabbe S. Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1986; 315: 1025-1026.
80. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14564-14568.

81. Ganther HE. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 1999; 20(9): 1657-1966.
82. Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Hancock JA, Golichowski AM. Multiple defects in the adipocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes heterogeneity in the number and a novel abnormality in subcellular localization of GLUT4 glucose transporters. *Diabetes* 1993; 42: 1773-1784.
83. Gasic S, Tian B, and Green A. Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in adipocytes by decreasing Gi protein concentrations. *J Biol Chem* 1999; 274: 6770-6775.
84. Guermouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37(11): 1932-1937.
85. Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 2004; 30: 13-19.
86. Gutteridge JMC. Invited review free radicals in disease processus: a compilation of cause and consequence. *Free Rad Res Comm* 1992; 19: 598-620.
87. Hadden DR. Geographic ethnic and racial variation in the incidence of gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 1985; 34(suppl 2): 8-12.
88. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269: 543-546.
89. Harris RB. Leptin much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 45-75.
90. Hotamisligil GS, Shargill NS, and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
91. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity diabetes. Central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Clin Invest* 1994; 94: 1543-1549.
92. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4854-4858.
93. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95: 2409-2415.
94. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeier HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensibility during the progression of type 2 diabetes in Rhesus monkeys. *Diabetes* 2001; 50: 1126-1133.



95. Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K, Eckel J. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 1995; 38: 764-771.
96. Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav* 2004; 83: 653-658.
97. Hunt JV, Smith CC, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990; 39(11): 1420-1424.
98. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S. The peroxisome proliferator-activated receptor: retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol* 1993; 11(1): 37-47.
99. Jensen DM, Sorensen B, Feilberg-Jorgensen N, Westergaard JG, Beck-Nielsen HL. Maternal and perinatal outcomes in 143 Danish women with gestational diabetes mellitus and 143 controls with a similar risk profile. *Diabet Med* 2000; 17: 281-286.
100. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-86.
101. Jimenez-Moleon JJ, Bueno-Cavanillas A, Luna-del-Castillo Jde D, Garcia-Martin M, Lardelli-Claret P, Galvez-Vargas R. Impact of different levels of carbohydrate intolerance on neonatal outcomes classically associated with gestational diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 102(1): 36-41.
102. Jolly M, Sebire N, Harris J, Robinson S, Regan L. The risks associated with pregnancy in women aged 35 years or older. *Hum Reprod* 2000; 15: 2433-2437.
103. Kajanachumpol S, Komindr S, Mahaisiriyodom A. Plasma lipid peroxide and antioxidant levels in diabetic patients. *J Med Assoc Thai* 1997; 80(6): 372-377.
104. Kalkhoff RK, Kinebah AH, Kim HJ. Carbohydrate and lipid metabolism during normal pregnancy: relationship to gestational hormones action. *Semin Perinatol* 1978; 2: 291-302.
105. Kalkhoff RK. Impact of maternal fuels and nutritional state on fetal growth. *Diabetes* 1991; 40 Suppl 2: 61-65.
106. Kamath U, Rao G, Raghobama C, Rai L, Rao P. Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. *Acta Paediatr* 1998; 87(6): 676-679.
107. Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Biegelmayer C, Schneider B, Ludvik B, Prager R, Waldhausl W. Increased plasma leptin in gestational diabetes. *Diabetologia* 2001; 44(2): 164-172.
108. Keen H. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *World Book of Diabetes in Practice, Elsevier Science publisher* 1986, 2: 8-15.

109. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95: 2111-2119.
110. Kersten S, Wahli W. Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *EXS* 2000; 89: 141-151.
111. Khan NA, Yessoufou A, Kim M, Hichami A. N-3 fatty acids modulate Th1 and Th2 dichotomy in diabetic pregnancy and macrosomia. *J Autoimmun* 2006; 26(4): 268-277.
112. Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Kowalska I, Kretowski A, Zarzycki W, Kinalska I. Lipid peroxidation, antioxidant defence and acid-base status in cord blood at birth: the influence of diabetes. *Horm Metab Res* 2001; 33(4): 227-231.
113. King H. Le diabète sucré. *OMS Aide mémoire* 1996; N° 135: 1-4.
114. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1992-2025: Prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care* 1998; 21(9): 1414-1431.
115. Kjos SL, Buchanan TA, Greespoon JS, Montoro M, Bernstein GS, Mestman JH. Gestational diabetes mellitus: the prevalence of glucose intolerance and diabetes mellitus in the first two months post partum. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 93-98.
116. Kjos SL, Peters RK, Xiang A, Henry OA, Montoro M, Buchanan TA. Predicting future diabetes in Latino women with gestational diabetes: utility of early post-partum glucose tolerance testing. *Diabetes* 1995; 44: 585-591.
117. Kjos SL, Peters RK, Xiang A, Schaefer U, Buchanan TA. Hormonal choices after gestational diabetes. Subsequent pregnancy, contraception, and hormonal replacement. *Diabetes Care* 1998; 21 (suppl 2): 50-57.
118. Kjos SL, Buchanan TA. Gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341(23): 1749-1756.
119. Knopp RH, Magee MS, Walden CE, Bonet B, Benedetti TJ. Prediction of infant birth weight by GDM screening test: importance of plasma triglyceride. *Diabetes Care* 1992; 15: 1605-1613.
120. Knowles WC, Barrett-Connor E, Fowles SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346: 393-403.
121. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, Roka R, Schernthaner G. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1042-1047.
122. Krinsky NL. Antioxydants function of carotenoides. *Free Rad Biol Med* 1989; 7(6): 617-635. Review.

123. Köhl C. Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21 (Suppl 2): 19-26.
124. Lacasa D, Taleb S, Keophipath M, Miranville A, Clement K. Macrophages-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of pro-inflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 2006; 148(2): 868-877.
125. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 371-379.
126. Lam KS, Li DF, Lauder IJ, Kung AW, Ma JT. Prediction of persistent carbohydrate intolerance in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1991; 12: 181-186.
127. Landon MB, Gabbe SG. Antepartum fetal surveillance in gestational diabetes mellitus. *Diabetes* 1985; 34 (suppl 2): 50-54.
128. Lapolla A, Dalfrà MG, Sanzari M, Fedele D, Betterle C, Masin M, Zanchetta R, Faggian D, Masotti M, Nucera V, Plebani M. Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine* 2005; 31(4): 280-287.
129. Leinonen J, Lehtimäki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Alho H. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non- insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1997; 417: 150-152.
130. Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 42: 880-885.
131. Lihn AS, Richelsen B, Pedersen SB, Haugaard SB, Rathje GS, Madsbad S, Andersen O. Increased expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 in HALS: implications for reduced adiponectin expression and plasma levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E1072-E1080.
132. Magee MS, Walder CE, Benedetti TJ, Knopp RH. Influence of diagnostic criteria on the incidence of gestational diabetes and perinatal morbidity. *JAMA* 1993; 269: 609-615.
133. Major CA, de Veciana M, Weeks J, Morgan MA. Recurrence of gestational diabetes: who is at risk? *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1038-1042.
134. Makimattila S, Liu ML, Vakkilainen J, Schlenzka A, Lahdenpera S, Syvanne M, Mantysaari M, Summanen P, Bergholm R, Taskinen MR, Yki-Jarvinen H. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants. *Diabetes Care* 1999; 22(6): 973-981.
135. Marx N, Mackmann N, Schönbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR $\alpha$  activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* 2001; 103: 213-219.

136. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res* 2002; 90(6): 703-710.
137. Marx N, Mackmann N, Schönbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* 2001; 103: 213-219.
138. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grüb M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res* 2002; 90(6): 703-710.
139. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3(9): 1029-1033.
140. Matarese G, La Cava A, Sanna V, Lord GM, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol* 2002; 23: 182-187.
141. Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 2005; 174: 6820-6828.
142. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 484-490.
143. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, LeGuen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 638-644.
144. McDermott MF. TNF and TNFR biology in health and disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001; 47: 619-635.
145. McFarlane CM, Tsakalacos N. The extended Pedersen hypothesis. *Clin Physiol Biochem* 1988; 6: 68-73.
146. McLachlan KA, O'Neal D, Jenkins A, Alford FP. Do adiponectin, TNFalpha, leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22(2): 131-138.
147. Mc Millan DE, Geevarghese PJ. Dietary Cyamide and Tropical Malnutrition Diabetes. *Diabetes Care* 1979; 2: 202-208.
148. Meller M, Qiu C, Vadachkoria S, Abetew DF, Luthy DA, Williams MA. Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. *Physiol Res* 2006; 55(5): 501-512.

149. Merzouk H, Madani S, Prost J, Loukidi B, Meghelli-Bouchenak M, Belleville J. Changes in serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions at birth and after 1 month of life in macrosomic infants of insulin-dependent diabetic mothers. *Eur J Pediatr* 1999; 158(9): 750-756.
150. Merzouk H, Madani S, Korso N, Bouchenak M, Prost J, Belleville J. Maternal and fetal serum lipid and lipoprotein concentrations and compositions in type 1 diabetic pregnancy: relationship with maternal glycemic control. *J Lab Clin Med* 2000; 136(6): 441-448.
151. Merzouk H, Madani S, Chabane Sari D, Prost J, Bouchenak M, Belleville J. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2000; 98(1): 21-30.
152. Merzouk H, Madani S, Hichami A, Prost J, Moutairou K, Belleville J, Khan NA. Impaired lipoprotein metabolism in obese offspring of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lipids*. 2002; 37(8): 773-781.
153. Merzouk H, Khan NA. Implication of lipids in macrosomia of diabetic pregnancy: can n-3 polyunsaturated fatty acids exert beneficial effects? *Clin Sci (Lond)* 2003; 105(5): 519-529.
154. Merzouk S, Hichami A, Madani S, Merzouk H, Berrouiguet AY, Prost J, Moutairou K, Chabane-Sari N, Khan NA. Antioxidant status and levels of different vitamins determined by high performance liquid chromatography in diabetic subjects with multiple complications. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22(1): 15-27.
155. Metzger BE. Biphasic effect of maternal metabolism on fetal growth: quintessential expression of fuel-mediated teratogenesis. *Diabetes* 1991; 40 (suppl 2): 99-105.
156. Mills JL, Jovanovic L, Knopp R, Aarons J, Conley M, Park E, Lee YJ, Holmes L, Simpson JL, Metzger B. Physiological reduction in fasting plasma glucose concentration in the first trimester of normal pregnancy: the diabetes in early pregnancy study. *Metabolism* 1998; 47: 1140-1144.
157. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6 but not tumor necrosis-alpha *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4196-4200.
158. Mohan V, Alberti KGMM. Diabetes in the tropics. In: Textbook of Diabetes mellitus. Edited by KGMM Alberti, RA de Fronzo, H Keen and P Zimmet. John Wiley and sons Ltd, 1992: 177-196.
159. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2970-2973.
160. Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 1998; 47: 1384-1391.
161. Monteiro B, Gninafon M, Amoussou KJ. Contribution à l'étude épidémiologique du diabète sucré de l'adulte au CNHU de Cotonou. *Méd Afrique Noire* 1991; 38: 263-269.

162. Morris AM, Sennello JA, Fayad RA, Eckel RH, Dinarello CA, Fantuzzi G. T cell-mediated hepatic inflammation modulates adiponectin levels in mice: role of tumor necrosis factor alpha. *Metabolism* 2006; 55: 555-559.
163. Moses RG. The recurrence rate of gestational diabetes mellitus in subsequent pregnancies. *Diabetes Care* 1996; 19: 1348-1350.
164. Müller A, Schott-Ohly P, Dohle C, Gleichmann H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of C57BL/6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiol* 2002; 205: 35-50.
165. Muller S, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and co-regulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia* 2002; 45: 805-812.
166. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 1995; 44: 1054-1058.
167. Nwokolo C, Oli J. Pathogenesis of juvenile Tropical. Pancreatitis syndrome. *Lancet* 1980 III; 456-459.
168. Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, Abdel-Aleem S. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism* 1999; 48: 1414-1417.
169. Orhan H, Onderoglu L, Yucel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 267(4): 189-195.
170. Osmond DT, Nolan CJ, King RG, Brennecke SP, Gude NM. Effects of gestational diabetes on human placental glucose uptake, transfer, and utilisation. *Diabetologia* 2000; 43: 576-582.
171. O'Sullivan JB, Charles D, Mahan CM, Dandrow RV. Gestational diabetes and perinatal mortality rate. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 116: 901-904.
172. Pacifico L, Di Renzo L, Anania C, Osborn JF, Ippoliti F, Schiavo E, Chiesa C. Increased T-helper interferon-gammasecreting cells in obese children. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 691-697.
173. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 1991; 53(4 Suppl): 1050S-1055S.
174. Palacio A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3040-3046.
175. Palinski W, Napoli G. The fetal origins of atherosclerosis: Maternal hypercholesterolemia and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy

influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. *The FASEB Journal* 2002; 16: 1348-1360.

176. Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulindependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 650-656.

177. Paolisso G, D'Amore A, Balbi V, Volpe C, Galzerano D, Giugliano D, Sgambato S, Varricchio M, D'Onofrio F. Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics [published errata appear in *Am J Physiol* 1994 Oct; 267 (4 Pt 1): section E following table of contents and 1994 Dec; 267 (6 Pt 3): section E following table of contents]. *Am J Physiol* 1994; 266: E261-E268.

178. Paolisso G, D'Amore A, Volpe C, Balbi V, Saccomanno F, Galzerano D, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism* 1994, 43: 1426-1429.

179. Paolisso G, Balbi V, Volpe C, Varricchio G, Gambardella A, Saccomanno F, Ammendola S, Varricchio M, D'Onofrio F. Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin dependent diabetics. *J Am Coll Nutr* 1995; 14: 387-392.

180. Papathanassoglou E, El-Haschimi K, Li XC, Matarese G, Strom T, Mantzoros C. Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes : kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *J Immunol* 2006; 176: 7745-7752.

181. Patane G, Piro S, Rabuazzo AM, Anello M, Vigneri R, Purrello F. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2000; 49: 735-740.

182. Pedersen J. Weight and length at birth of infants of diabetic mothers. *Acta Endocrinol* 1954; 16: 330-342.

183. Persson B, Hanson U. Neonatal morbidities in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21 (Suppl 2): B79-84.

184. Peters RK, Kjos SL, Xiang A, Buchanan TA. Long-term diabetogenic effect of single pregnancy in women with previous gestational diabetes. *Lancet* 1996; 347: 227-230.

185. Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta). *Mol Cell Biol* 2000; 20(14): 5119-5128.

186. Pettitt DJ, Baird HR, Aleck KA, Bennett PH, Knowler WC. Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. *N Engl J Med* 1983; 308: 242-245.

187. Pettitt DJ, Aleck KA, Baird R, Carraher MJ, Bennett PH, Knowler WC. Congenital susceptibility to NIDDM: role of intrauterine environment. *Diabetes* 1988; 37: 622-628.
188. Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel JY, Leng JJ, Gin H. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2004; 37(4): 293-298.
189. Philipson EH, Super DM. Gestational diabetes: does it recur in subsequent pregnancy? *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 1324-1331.
190. Pinget M. Diabète de type 2. *Imagerie fonctionnelle et métabolique* 2001; 25: 103-114.
191. Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dorner G. Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia*. 1997; 40(9): 1094-1100.
192. Pond CM. Adipose tissue and the immune system. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73: 17-30.
193. Porcellati F, Pampanelli S, Rossetti P, Cordoni C, Marzotti S, Scionti L, Bolli GB, Fanelli CG. Counterregulatory hormone and symptom responses to insulin-induced hypoglycaemia in the postprandial state in humans. *Diabetes* 2003; 52: 2774-2783.
194. Pribylova H, Dvorakova L. Long-term prognosis of infants of diabetic mothers. Relationship between metabolic disorders in newborns and adult offspring. *Acta Diabetol* 1996; 33(1): 30-34.
195. Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 1997; 46: 1939-1944.
196. Rabinovitch A. Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 1994; 43(5): 613-621.
197. Rajdl D, Racek J, Steinerova A, Novotny Z, Stozicky F, Trefil L, Siala K. Markers of oxidative stress in diabetic mothers and their infants during delivery. *Physiol Res* 2005; 54(4): 429-36
198. Rao RH. The role of under-nutrition in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1984; 7: 595-601.
199. Rayner DV, Trayhum P. Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *J Mol Med* 2001; 79: 8-20.
200. Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Moller W, Tritschler H, Pereira P, Halliwell B. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1999; 448: 120-122.
201. Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000; 21(10): 479-483.



202. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7614-7619.
203. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell* 1999; 4(4): 611-617.
204. Ruan H, Lodish HF. Regulation of insulin sensitivity by adipose tissue-derived hormones and inflammatory cytokines. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 297-302.
205. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59(2): 99-105.
206. Sacks DA, Greenspoon JS, Abu-Fadil S, Henry HM, Wolde-Tsadik G, Yao JF. Toward universal criteria for gestational diabetes: the 75-gram glucose tolerance test in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 607-614.
207. Samad F, Uysal KT, Wiesbrock SM, Pandey M, Hotamisligil GS, Loskutoff DJ. Tumor necrosis factor is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 66902-66907.
208. Sameshima H, Kamitomo M, Kajiya S, Kai M, Furukawa S, Ikenoue S. Early glycemic control reduces large-for-gestational-age infants in 250 Japanese gestational diabetes pregnancies. *Am J Perinatol* 2000; 17(7): 371-376.
209. Santini SA, Marra G, Giardini B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997; 46: 1853-1858.
210. Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7265-7270.
211. Satyaprasad SV, Satish CK, Mulchand SP. Persistence of metabolic consequences in the progeny of rats fed a HC formula in their early post natal life. *Am J Physiol* 1995; 269: 731-738.
212. Schaefer UM, Songster G, Xiang A, Berkowitz K, Buchanan TA, Kjos SL. Congenital malformations in offspring of women with hyperglycemia first detected during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1165-1171.
213. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270(45): 26746-26749.
214. Schobitz B, De Kloet ER, Sutanto W, Holsboer F. Cellular localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain. *Eur J Neurosci* 1993; 5: 1426-1435.

215. Schwartz R, Teramo KA. Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn. *Semin Perinatol* 2000; 24(2): 120-135.
216. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 2002; 51: 3391-3399.
217. Sermer M, Naylor CD, Farine D, Kenshole AB, Ritchie JW, Gare DJ, Cohen HR, McArthur K, Holzappel S, Biringier A. The Toronto tri-Hospital gestational diabetes project. *Diabetes Care* 1998; 21(suppl 2): 33-42.
218. Sidibe EH. Complications majeures du diabète sucré en Afrique. *Ann Med Int* 2000; 151: 624-628.
219. Simmons D, Breier BH. Fetal overnutrition in Polynesian pregnancies and in gestational diabetes may lead to dysregulation of the adipoinular axis in offspring. *Diabetes Care* 2002; 25(9): 1539-1544.
220. Sinclair AJ. Free radical mechanisms and vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Rev* 1993; 2: 7-10.
221. Sivan E, Whittaker PG, Sinha D, Homko CJ, Lin M, Reece EA, Boden G. Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179(5): 1128-1132.
222. Smirnoff N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm* 2001; 61: 241-266.
223. Snyder J, Gray-Donald K, Koski KG. Predictors of infant birth weight in gestational diabetes. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 1409-1414.
224. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 1998; 98: 2088-2093.
225. Staiger K, Stefan N, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Machicao F, Kellerer M, Stumvoll M, Fritsche A, Haring HU. Adiponectin is functionally active in human islets but does not affect insulin secretory function or beta-cell lipoapoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6707-6713.
226. Stefan N, Bunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tataranni PA. Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(10): 4652-4656.
227. Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Weyer C, Lindsay RS, Youngren JF, Havel PJ, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. Plasma adiponectin concentration is associated with skeletal muscle insulin receptor tyrosine phosphorylation, and low plasma concentration precedes a decrease in whole-body insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 2002; 51: 1884-1888.
228. Stephen JM, Pilch PF. The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT 4, the major insulin responsive glucose transporter. *Endocr Rev* 1995; 16: 529-533.

229. Sternberg EM. The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med* 1992; 117: 854-866.
230. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Colch)* 1996; 90: 255-260.
231. Tallarigo L, Giampetro O, Penno G, Miccoli R, Gregori G, Navalesi R. Relation of glucose tolerance to complications of pregnancy in nondiabetic women. *N Engl J Med* 1986; 315: 989-992.
232. Tchobroutsky G. Diabète sucré, in: *Traité de Médecine*, 2ème ed. Flammarion *Médecine Science*, Paris 1987.
233. Telci A, Cakatay U, Salman S, Satman I, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 50(3): 213-223.
234. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3(5): 373-84.
235. Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wright SD, Berger J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide *in vitro* or *in vivo*. *J Immunol* 2000; 164: 1046-1054.
236. Thivolet C, Nicolino M, Monbeig S, Estour B, Halimi S, Robert M, Orgiazzi J, Chatelain P; GRADI study. Combination of autoantibody markers and risk for development of type 1 diabetes: results from a large french cohort of family members. *Diabetes Metab (Paris)* 2002; 28: 279-285.
237. Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sonksen PH. Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci (Colch)* 1996; 91: 575-582.
238. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Nightingale P, Kendall MJ, Brydon P, Dunne F. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106(1): 93-98.
239. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994; 8(10): 1224-1234.
240. Torgerson JS, Hauptman J, Boldrin MN, Sjostrom L. Xenical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* 2004; 27: 155-161.
241. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92: 347-355.

242. Trayhurn P, Bing C, Wood IS. Adipose tissue and adipokines-energy regulation from the human perspective. *J Nutr* 2006; 136: 1935-1939.
243. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, Lee YH, Huang IT, Ho SC, Chu CH. Maternal plasma adiponectin concentrations at 24 to 31 weeks of gestation: negative association with gestational diabetes mellitus. *Nutrition* 2005; 21(11-12): 1095-1099.
244. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344: 1343-1350.
245. Vella A, Service FJ, O'Brien PC. Glucose counterregulatory hormones in the 72-hour fast. *Endocr Pract* 2003; 9: 115-118.
246. Velussi M, Cernigoi AM, De Monte A, Dapas F, Caffau C, Zilli M. Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J Hepatol* 1997; 26 : 871-879.
247. Verier-Mine O, Timsit J. Quelle(s) définition(s) du diabète gestationnel doit-on choisir ? *Diabetes Metab* 1997; 23: 15-16.
248. Verwaerde C, Delanoye A, Macia L, Tailleux A, Wolowczuk I. Influence of high-fat feeding on both naive and antigenexperienced T-cell immune response in DO10.11 mice. *Scand J Immunol* 2006; 64: 457-466.
249. Viardot A, Grey ST, Mackay F, Chisholm D. Potential anti-inflammatory role of insulin via the preferential polarization of effector T cells towards a T-helper 2 phenotype. *Endocrinology* 2007; 148(1): 346-353.
250. Vigneron A, Cherier J, Barre B, Gamelin E, Coqueret O. The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol Chem* 2006; 281: 34742-34750.
251. Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and noninsulin- dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1996, 13: 715-719.
252. Volk T, Dopfmer UR, Schmutzler M, Rimpau S, Schnitzler H, Konertz W, Hoeflich C, Docke WD, Spies CD, Volk HD, Kox WJ. Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. *Cytokine* 2003; 24(6): 237-243.
253. Wallenius K, Wallenius V, Sunter D, Dickson SL, Jansson JO. Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 560-565.

254. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808.
255. Weiss R, Dufour S, Groszmann A, Petersen K, Dziura J, Taksali SE, Shulman G, Caprio S. Low adiponectin levels in adolescent obesity: a marker of increased intramyocellular lipid accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5): 2014-2018.
256. West KM. Diabetes in the tropic: some lessons for Western diabetology. Secondary diabetes: the spectrum of the diabetic syndrome. *Raven Press*, 1980: 249-255.
257. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(5): 1930-1935.
258. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus, Second report. Technical Report Series. Vol. 646. Geneva: World Health Organisation, 1980.
259. Wierrusz-Wysocka B, Wysicky H, Byks H, Zozulinska D, Wykretowicz A, Kazmierczak M. Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 27: 193-197.
260. Will JC, Byers T. Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? *Nutr Rev* 1996; 54: 193-202.
261. Winkler G, Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Speer G, Hajos P, Salamon F, Turi Z, Kovacs M, Vargha P, Karadi I. Tumour necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 56: 93-99.
262. Wood SC, Dharma Rao T, Frey B. Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/cBy mice induces a T cell proliferation defect in thymocytes which is reversible by interleukin-4. *Cell Immunol* 1999; 192: 1-12.
263. Wolf AM, Wolf D, Avila MA, Moschen AR, Berasain R, Enrich B, Rumpold H, Tilg H. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol* 2006; 44: 537-543.
264. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7(8): 941-946.
265. Yessoufou A, Moutairou K, Girard A, Fatoke M, Prost J, Ahissou H, Djrolo F, Avode G, Amoussou-Guenou D, Hichami A, Khan NA. Antioxidant status in alcohol-related diabetes mellitus in Beninese subjects. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2005; 51 Suppl: OL849-858.
266. Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of T cell differentiation. *Endocrinology* 2006; 147(9): 4410-4418.

267. Yessoufou A, Soulaïmann N, Merzouk SA, Moutairou K, Ahissou H, Prost J, Simonin AM, Merzouk H, Hichami A, Khan NA. N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30(5): 739-750.
268. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 1995; 38: 201-210.
269. Yoshikawa T., Yamamoto Y., Naito Y. Free radicals in chemistry, *Biology and Medicine*, Ed. Oica International, Londres, 2000.
270. Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y, Fujii S. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 2005; 1(6): 371-378.
271. Zambon A, Gervois P, Pauletto P, Fruchart JC, Staels B. Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: clinical and experimental evidence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(5): 977-986.
272. Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 2001; 64(1): 33-44.
273. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.

---

## Physiopathologie du diabète gestationnel et de la macrosomie : rôle des cytokines, des adipokines, du statut antioxydant et de PPAR

---

Le diabète gestationnel (DG) est un trouble de la tolérance glucidique de gravité variable, survenant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse, quel que soit le traitement nécessaire et son évolution après l'accouchement. Il est associé, à court et à long terme, à un ensemble de complications ou pathologies tant chez la mère que chez l'enfant. Nous avons étudié le rôle des cytokines, des adipokines, du statut anti-oxydant et de PPAR au cours du diabète gestationnel et de la macrosomie. Notre étude a montré que le diabète gestationnel et la macrosomie sont associés à une perturbation du métabolisme lipidique et une altération des statuts antioxydant et immunitaire. Le DG était lié à une diminution de l'adiponectine et des cytokines Th1 et une augmentation de la leptine et des cytokines inflammatoires alors que la macrosomie est associée à une augmentation des cytokines Th1 et une diminution de toutes ces hormones relatives à l'obésité (IL-6, TNF- $\alpha$ , leptine et adiponectine). Plusieurs altérations observées à la naissance dans le métabolisme des carbohydrates et des lipides chez les enfants issus de mères diabétiques persistent encore à l'âge adulte. Il semble que la programmation *in utero* au cours du diabète gestationnel crée une "mémoire métabolique" qui est responsable de l'obésité et des altérations chez les nouveau-nés macrosomiques. PPAR- $\alpha$ , un stimulateur du catabolisme des lipides et de l'immunosuppression, constituerait une cible potentielle dans le traitement de l'hyperlipidémie et de l'état inflammatoire qui caractérise le diabète gestationnel et la macrosomie.

**Mots-clés :** Diabète gestationnel, macrosomie, cytokines, adipokines, statuts antioxydant et immunitaire, PPAR

---

## Physiopathology of gestational diabetes and macrosomia: role of cytokines, adipokines, antioxidant status and PPAR

---

Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as "carbohydrate intolerance of variable severity with onset or first recognition during pregnancy", whatever the necessary treatment and its evolution in the post partum. It is related to a number of complications or pathologies as well as in mother and her newborn, with short and long-term. In this study, we investigated the role of cytokines, adipokines, antioxidant status and PPAR during gestational diabetes and macrosomia. Our study has demonstrated that these pathologies are associated with lipid metabolism disturbance and alteration of antioxidant and immune status. Gestational diabetes is linked to the down-regulation of adiponectin along with Th1 cytokines and upregulation of leptin and inflammatory cytokines whereas macrosomia was associated with the up-regulation of Th1 cytokines and the down-regulation of the obesity-related agents (IL-6, TNF- $\alpha$ , leptin and adiponectin). Several alterations observed at birth in carbohydrates and lipids metabolism in the children born to diabetic mothers still persist at the adulthood. It seems that *in utero* programming during diabetic pregnancy creates a "metabolic memory" which is responsible for the development of obesity and alterations in macrosomic offspring. PPAR- $\alpha$ , an immunosuppressive and lipid catabolism activator, may constitute a potential target in the treatment of hyperlipidemia and inflammatory state which characterize gestational diabetes and macrosomia.

**Key words:** Gestational diabetes, macrosomia, cytokines, adipokines, antioxidant and immune status, PPAR

---