



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE A L'UFR Sciences de Santé**

Ecole doctorale n°554

Environnement Santé

Doctorat de Physiologie

Par

Eve RIGAL

Impact à long terme de la programmation nutritionnelle postnatale sur le risque cardio-métabolique et sur la sensibilité aux lésions d'ischémie-reperfusion *in vivo* chez la souris

Thèse présentée et soutenue à l'UFR des Sciences de Santé, le 19 décembre 2023

Composition du Jury :

Pr Anne GARNIER
Pr Elise BELAIDI
Pr Cyril REBOUL
Dr Nathalie ROSENBLATT
Pr Charles GUENANCIA
Pr Catherine VERGELY

Université Paris-Saclay
Université de Lyon
Université d'Avignon
Université de Lausanne
Université de Bourgogne
Université de Bourgogne

Présidente
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Codirecteur de thèse
Directrice de thèse

Remerciements

À ma directrice de thèse, le professeure **Catherine VERGELY-VANDRIESSE**,

Merci pour la confiance que tu me portes depuis mon tout premier stage de master 1 il y a plus de 10 ans maintenant. Tes nombreuses qualités scientifiques et humaines font de toi une femme exceptionnelle et inspirante. Je te remercie pour ton soutien indéfectible dans ma vie professionnelle et personnelle ainsi que pour ton accompagnement qui me permet d'être une chercheuse intègre et rigoureuse.

À mon co-directeur de thèse, le Professeur **Charles GUENANCIA**,

Ton parcours remarquable t'a fait évoluer de camarade de master 2 (surnommé Aziz) à co-directeur de ma thèse. Merci de m'avoir transmis de nombreuses connaissances lors de discussions sérieuses mais toujours ponctuées d'un brin d'humour. Je te remercie également pour ta créativité et ta rigueur scientifique ainsi que pour ton accompagnement tout au long de ce travail.

À l'intention des membres du jury,

Au professeure **Elise BELAIDI-CORSAT**,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Je te remercie pour ta bienveillance, ta disponibilité et pour les échanges scientifiques lors de congrès, toujours enrichissants et inspirants pour moi et pour la continuité de ce projet.

Au Professeur **Cyril REBOUL**,

Je te remercie de m'avoir fait l'honneur d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. Merci pour ta disponibilité et pour le temps que tu as consacré à juger mon travail.

Au professeure **Anne GARNIER**

Je vous exprime mes remerciements sincères pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail de thèse. Merci pour votre disponibilité et pour votre expertise dans le domaine de la physiopathologie cardiovasculaire.

À la maitresse de conférences **Nathalie ROSENBLATT-VELIN**

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail, que tu as vu naître et que tu as accompagné en tant que membre de mon comité scientifique de suivi de thèse. Tes nombreux conseils toujours avisés m'ont permis de faire évoluer mes travaux. Merci infiniment pour l'intérêt que tu portes à notre thématique, pour ton soutien lors des congrès de Cardiologie en France et en Suisse et pour ton regard bienveillant et constructeur vis-à-vis de ce travail.

J'adresse un remerciement particulier au Professeur émérite **Luc Rochette**, qui m'a accueilli dans son laboratoire pour mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci d'avoir suivi ce projet en tant que membre de mon comité scientifique de suivi de thèse. Je

vous suis reconnaissante pour votre bienveillance, pour la transmission de votre savoir ainsi que pour la bonne humeur communicative dont vous faites preuve quotidiennement. Soyez assuré de mon éternelle admiration.

Un grand merci à tout le personnel du centre de zootechnie, notamment à Valérie Saint Giorgio, pour avoir pris soin des rongeurs qui m'ont donné des résultats encourageants.

Merci aux personnes qui partagent mon quotidien au laboratoire : Marie, on a partagé ensemble cette folle aventure qu'est la thèse, avec des fous rires mais aussi des « coups de mou ». Merci pour ta bienveillance, ton amitié et ton précieux soutien ; Tatiana, Babeth et Maeva, l'équipe « d'à côté » : merci pour votre soutien, votre aide technique, votre humour et pour tous ces moments de partage. Merci également à Geoffrey, notre fournisseur officiel de cookies remontent moral. Merci également à Sandy pour ton aide technique ainsi qu'aux étudiants passés au labo (Julia, Camille, Mathilde et tant d'autres) et merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette thèse.

Merci infiniment à tout-es mes amis-es qui sont toujours là pour partager des rires, des larmes, des coups de folie, des voyages... Merci à Angélique, Joachim, Zouzou, Jérem, Soph, Charlotte, Louis, Mel, Adrien, Flore, Léonard, Marine, Pierre, Camille et Val et merci à la team des vacances et des « mercredo apéro » : Marie, Scanz, Z, Enzo, Pepette, Dadet, , Marietou, Claire, Foultok et Mr Munch. Votre présence m'est indispensable. Soyez assurés-es que chacun-e d'entre vous me nourrit et m'élève à devenir une personne meilleure. Un merci tout particulier à Céline, mon amie de toujours, tu es la sœur que je n'ai jamais eue, tu es mon rayon de soleil de positivité depuis 30 ans.

À mes parents, Pascale et Thierry, vous êtes des êtres exceptionnels. Merci pour votre soutien sans faille et pour vos encouragements à toujours donner le meilleur de moi-même. Merci à mes frères, Jean-Baptiste et Pierre Simon pour vos nombreux conseils et votre présence indispensable. À ma belle-sœur Emmanuelle et à mes neveux et nièces, Ysée, Yolan, Thaïs et Tao, vous êtes mes rayons de soleil. Je remercie ma grand-mère Ninou, ton soutien et ton admiration pour mon travail ont été source de motivation et d'encouragements. Je ne fais que marcher dans les empreintes « scientifiques » laissées par Mamie. Merci à ma belle-famille, Martine, Bernard, Bast et Gégé pour votre soutien et vos gentilles attentions.

À Antoine, merci pour ton soutien, ta gentillesse et pour l'amour que tu me portes au quotidien. Ta sagesse est une vraie source d'inspiration. À Justin et Clémentine, gardez votre joie de vivre et votre innocence d'enfants. Vous êtes la famille que j'ai choisie...

« Dans la vie rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Pr Marie Curie

Table des matières

Liste des figures : introduction générale.....	4
Liste des figures : article 1.....	5
Liste des figures : article 2.....	6
Liste des tableaux : article 1.....	7
Liste des tableaux : article 2.....	7
Liste des abréviations.....	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	12
A/ Surpoids et obésité.....	14
I/ Définitions.....	14
II/ Facteurs de risques du surpoids et de l'obésité.....	15
1/ Facteurs génétiques.....	15
2/ Facteurs environnementaux.....	16
3/ Facteurs endocriniens.....	16
4/ Facteurs environnementaux et endocriniens précoces.....	18
III/ Complications cardio-métaboliques du surpoids et de l'obésité.....	19
1/ Complications cardiovasculaires du surpoids et de l'obésité.....	19
2/ Conséquences métaboliques du surpoids et de l'obésité.....	23
3/ Paradoxe de l'obésité.....	28
4/ Syndrome métabolique.....	29
5/ Inégalités liées au sexe.....	30
B/ Le tissu adipeux : organe au cœur du surpoids et de l'obésité.....	31
I/ Définition.....	31
II/ Le tissu adipeux blanc (WAT).....	31
III/ Le tissu adipeux brun.....	32
IV/ Le tissu adipeux beige.....	33
V/ Les tissus adipeux cardiaques.....	33
1/ Le tissu adipeux épiqueur (TAE).....	34
2/ Le tissu adipeux péricardique (TAP) :.....	35
C/ La programmation périnatale du risque cardio-métabolique.....	36
I/ Origines développementales de la santé.....	36
II/ Modèle expérimental de la suralimentation postnatale (SAPN).....	38
1/ Généralités.....	38
2/ Conséquences cardio-métaboliques d'une SAPN.....	39
3/ Les mécanismes épigénétiques.....	44
III/ Ischémie reperfusion cardiaque.....	46

1/ Généralités sur l'ischémie reperfusion cardiaque	46
2/ Conséquences moléculaires et cellulaires de l'ischémie cardiaque	48
3/ Conséquences moléculaires et cellulaires de la reperfusion cardiaque.....	49
4/ Voies de cardioprotection.....	52
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	55
MATÉRIELS ET MÉTHODES	59
1/ Éthique	61
2/ Modèle expérimental de suralimentation postnatale.....	61
3/ Exploration cardiaque	63
4/ Tests glycémiques	67
5/ Mesures de biologies moléculaires : réactions quantitatives en chaîne par polymérase en temps réel (rt-qPCR).....	68
6/ Tests ELISA	69
7/Analyses statistiques.....	71
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	72
Article 1 : Impact à court et long terme d'une SAPN sur le risque cardiométabolique et la sensibilité du cœur aux lésions d'ischémie reperfusion cardiaque <i>in vivo</i> chez la souris.....	73
Abstract	77
Introduction.....	79
Material and methods.....	80
Results	85
Discussion	88
References.....	93
Tables	96
Figures	99
Conclusion	105
Article 2 : Dimorphisme sexuel dans l'impact cardio-métabolique de la suralimentation postnatale chez les souris.....	106
I/ Introduction	108
II/ Résultats.....	110
1/ Évolution du poids corporel.....	110
2/ Graisse péricardique	112
3/ Suivi de la fonction cardiaque.....	113
4/ Sensibilité du cœur aux lésions d'ischémie reperfusion <i>in vivo</i>	116
(a) Aires à risque	116
(b) Taille de l'infarctus	117

5/ Métabolisme du glucose.....	118
(a) Glycémie basale.....	118
(b) Test de tolérance au glucose : ipGTT.....	119
(c) Test de tolérance à l'insuline : ipITT.....	121
DISCUSSION GÉNÉRALE	127
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	133
ANNEXES.....	137
I/ Production scientifique.....	139
1/ Communications orales :	144
2/ Communications affichées :.....	144
3/ Remerciements :	146
4/ Enseignements réalisés :	146
BIBLIOGRAPHIE.....	147

Liste des figures : introduction générale

Figure 1 : Mécanismes de régulation de la prise alimentaire. NPY : neuropeptide Y, AgRP : agouti related peptide, POMC : pro-opiomélanocortine ; CART : cocain and amphetamine related transcript ; CCK : cholécystokinine ; PYY : peptide YY ; GLP-1 : glucagon like peptide ; α -MSH : alpha melanocyte stimulating hormone ; ; CRH : corticolibérine ; TRH : la thyrolibérine ; BDNF : brain derived natriuretic peptide [29].	18
Figure 2 : Mécanismes de l'athérosclérose [41]. LDL : lipoprotéine de faible densité ; Ma : macrophage ; Mas : macrophages spumeux ; CML : cellule musculaire lisse ; Co : collagène.	20
Figure 3 : Physiopathologie de la cardiomyopathie induite par l'obésité. Adaptée de la publication de Alpert et al, 2001 [23]. FC : fréquence cardiaque, VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit	22
Figure 4 : Voies de signalisation endothéliales impliquées dans la régulation du tonus vasculaire par l'insuline, en situation physiologique (A) ou pathologique (B) [75]. SHC : src homologous and collagen protein ; GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2 ; SOS : son of sevenless ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; MAPK : mitogen-activated protein kinases ; ET-1 : endothelin-1 ; IRS : insulin receptor substrate ; PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase ; PDK1 : 3-phosphoionisotide-dependent protein kinase-1 ; PIP2 : phosphatidylinositol 4-5 bi phosphate ; PIP3 : phosphatidylinositol 3-4-5 bi phosphate ; Akt : Protein kinase B. eNOS : NO synthase endothéliale ; NO : monoxyde d'azote.	27
Figure 5 : Schéma de la localisation des tissus adipeux épicaudique, péricardique et périvasculaire chez l'Homme.	36
Figure 6 : Modèle de SAPN par réduction de la taille des portées (A) et suivi du poids corporel des animaux (B). Significativement différent du groupe NA du même sexe et âge : * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$. Significativement différent au sein d'un groupe du même âge mais de sexe opposé : \$\$\$: $p < 0,001$.	38
Figure 7 : Conséquences cardiovasculaires et métaboliques d'une SAPN chez le rongeur. TA : Tissu adipeux ; ICEV : ischémie cardiaque ex vivo ; I/R : ischémie reperfusion ; IDM : infarctus du myocarde	43
Figure 8 : Mécanismes épigénétiques [205]. Ac : acétylation ; Me : méthylation ; HDAC ; histone désacétylase ; HAT : histone acétylase ; MBP : methylCPG binding protein ; ARNm : ARN messenger	45
Figure 9 : Cinétique d'extension temporelle de l'infarctus du myocarde [217].	47
Figure 10 : Modifications de l'homéostasie calcique au sein des cardiomyocytes induites par l'ischémie. NHE : échangeur Na^+/H^+ ; Ca^{2+} -ATPase : pompe calcique dépendante de l'ATP ; NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [157]	49
Figure 11 : Modifications cellulaires induites par la reperfusion myocardique. RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PLB : phospholamban ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} - ATPase	51
Figure 12 : Voies de cardioprotectionh RISK et SAFE. RCPG : récepteur couplé aux protéine G ; PI3K : phosphatidyl inositol 3 kinase ; GSK3 β : glycogène synthase kinase 3 β ; NOS : NO synthase ; NO : monoxyde d'azote ; PKC : protéine kinase C ; TNF- α : tumor necrosis factor α ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; ERK 1 : extracellular signal-regulated kinase ; JAK : janus kinase ; STAT3 : signal ransducer and activator of transcription 3.	54
Figure 13 : Schéma expérimental de l'étude 1. NA : Normo alimentés ; SAPN : Suralimentés post natalement ; PCR : polymerase chain reaction ; ipGTT : intra peritoneal glucose tolerance test ; ipITT : intra peritoneal insulin tolerance test.	62
Figure 14 : Schéma expérimental de l'étude 2. NA : Normo alimentés ; SAPN : Suralimentés post natalement ; ipGTT : intra peritoneal glucose tolerance test ; ipITT : intra peritoneal insulin tolerance test.	62
Figure 15 : Visualisation du ventricule gauche en coupe parasternale grand axe (A) et parasternale petit axe (B) en mode luminosité (B-mode) en fin de diastole. OD : oreillette droite, OG : oreillette gauche, VG : ventricule gauche, VD : ventricule droit, SIV : septum interventriculaire.	63
Figure 16 : Visualisation du ventricule gauche en coupe parasternale grand axe (A) et petit axe (B) en mode mouvement (M-mode, C) en fin de diastole.	64
Figure 17 : Enregistrement de Doppler pulsé (A) et tissulaire (B) afin d'étudier les paramètres de la fonction diastolique par la mesure des ondes E, A, E' et A'.	65
Figure 18 : Electrocardiogramme normal (A) et altéré par une ischémie cardiaque (B).	66
Figure 19 : Coupes de cœurs marqués au bleu Evans (A) et au TTC (B) pour la quantification de l'AAR et de la taille d'infarctus.	67

Liste des figures : article 1

Figure 1: Evolution of body weight in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice from 24 days up to 18 months of age. Results are expressed as medians \pm min to max values, P was calculated by One-way-ANOVA: *: $p < 0.05$ was considered significantly different, ***: $p < 0.001$.	99
Figure 2: Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF, %) in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice from 2 to 18 months of age. The numbers (n) are listed by age for the two groups, LVEF was calculated by measuring the left ventricular internal diameter in the end diastolic and end systolic by echocardiography (VEVO 770, Visualsonics). Data are expressed as medians \pm min to max values. P was calculated by one-way ANOVA, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.	100
Figure 3: Quantification of area at risk (AAR, A) and infarct size (IS, B) in hearts of postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4 to 12 months of age after in vivo ischemia (45 min) induced by ligation of LAD coronary artery followed by 24 h of reperfusion. The AAR was quantified by Evan's blue coloration and the IS using TriphenylTetrazolium Chloride staining. The images were treated using image J software. Data are expressed as medians \pm min to max values, P was calculated by Student's t-test, within the same age, *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$.	101
Figure 4: Evaluation of glucose metabolism in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 2 to 12 months of age. Evolution of blood glucose (A, C) and area under the curve of blood glucose (B, D) after intraperitoneal glucose (A, B) or insulin injection (C, D) in NF and PNOF mice (8 mice/group). Area under curve were calculated by adding area at each timepoint. Data are expressed as means \pm SEM, P was calculated by Mann-Whitney test, within the same age, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.	102
Figure 5: Mass of the pericardial fat and (A) quantitative rt-qPCR analysis for activin A (B), IL-6 (C) and TNF-α (D) in pericardial adipose tissue (PAT) of postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4 to 12 months of age. The pericardial adipose tissue mass was weighted after tissue harvesting. RNAs were extracted from PAT after harvesting. Data are expressed as the fold change relative to the beta actin gene expression. Data are expressed as means \pm SEM, P was calculated by student's t-test: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.	103
Figure 6: Quantitative rt-PCR analysis for PI3K (A), Akt (B), GSK3-β(C), ERK1 (D) and STAT3 (E) in left ventricle of postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4, 6 and 12 months of age. RNAs were extracted from total left ventricle after harvesting. Data are expressed as the fold change relative to the beta actin gene expression and represent the mean \pm SEM. P was calculated by one-way ANOVA test: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.	104

Liste des figures : article 2

- Figure 1 : Évolution du poids corporel des souris mâles (A) et femelles (B) des groupes normo alimentés (NA, blanc) et suralimentés (SAPN, rouge) après la naissance, âgés de 24 jours à 18 mois.** Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$. Significativement différent au sein d'un groupe du même âge mais de sexe opposé : \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ 110
- Figure 2 : Masse du tissu adipeux rapportée au poids corporel des animaux NA et SAPN, mâles (A) et femelles (B).** Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe * : $p < 0,05$. Significativement différent au sein d'un même groupe mais d'âge différent : # : $p < 0,05$. Significativement différent au sein d'un groupe du même âge mais de sexe opposé : \$\$\$ $p < 0,001$... 112
- Figure 3 : Évolution de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) des animaux NA et SAPN, mâles (A) et femelles (B).** Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$. Significativement différent au sein d'un groupe du même âge mais de sexe opposé : \$: $p < 0,05$ 113
- Figure 4 : Quantification des aires à risque des animaux NA et SAPN, mâles (A) et femelles (B) après une ischémie cardiaque de 45 min, suivie de 24 h de reperfusion.** Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. NS : Non significatif. 116
- Figure 5 : Quantification des tailles d'infarctus des animaux NA et SAPN mâles (A) et femelles (B) après une ischémie cardiaque de 45 mins, suivi de 24h de reperfusion.** Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$ 117
- Figure 6 : Glycémie basale des animaux mâles (A) et femelles (B) après une mise à jeun de 6 heures.** Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$ 118
- Figure 7 : Évolution de la glycémie (A) et aires sous la courbe (B, C) des animaux NA et SAPN à différents âges, chez les mâles (A, B) et les femelles (C) après injection intrapéritonéale de glucose (2 g/kg) lors d'un test de tolérance au glucose (ipGTT).** Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Significativement différent au sein d'un même groupe mais d'âge différent : # : $p < 0,05$; ### : $p < 0,001$. Significativement différent du même groupe et du sexe opposé : \$: $p < 0,05$ 119
- Figure 8 : Evolution de la glycémie (A) et aires sous la courbe (B, C) des animaux NA et SAPN à différents âges, chez les mâles (B) et les femelles (C) après injection intrapéritonéale d'insuline (0.75 UI/kg) lors d'un test de résistance à l'insuline (ipITT).** Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Significativement différent au sein d'un même groupe mais d'âge différent : # : $p < 0,05$; ### : $p < 0,001$ 121

Liste des tableaux : matériels et méthodes

Table 1 : Séquence des amorces des gènes cibles utilisés pour l'exploration moléculaire par rt-qPCR.....	69
---	-----------

Liste des tableaux : article 1

Table 1: Forward and reverse sequences of primers used for the amplification of mouse genes	96
--	-----------

Table 2: Echocardiographic parameters from postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4, 6 and 12 months of age. Acquisition were made using the VEVO 770 imaging system (Visualsonics) with a 30 MHz probe. LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction; LVIDd: Left Ventricular Internal Diameters diastolic; E: early diastolic transmitral flow velocities; A: late diastolic transmitral flow velocities; e': peak early-diastolic annular velocities. P was calculated by One-way ANOVA test, *: p<0.05, **p<0.01; ****: p<0.001: significantly different from NF group.	97
--	-----------

Table 3: Circulating plasma concentration of Activin A, IL-6 and GDF-15 in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice, 24 hours after in vivo myocardial ischemia reperfusion. Results are obtained in thawed mice plasma. The amount of TNF-α and IL-1β were undetectable (not shown). P was calculated by One-way ANOVA test, *: p<0.05: significantly different from NF group; #: p<0.05, 12 months different to 4 months in the same group.	98
---	-----------

Liste des tableaux : article 2

Tableau 1 : Caractéristiques échocardiographiques des animaux mâles (A) et femelles (B) aux différents âges. VG : ventricule gauche ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; LVIDd : diamètre interne du ventricule gauche en fin de diastole ; Onde E : onde protodiastolique, représentant le remplissage passif du ventricule ; Onde A : contraction auriculaire permettant le remplissage ventriculaire actif ; Rapport E/A : rapport entre les vitesses maximales des ondes E et A (indice de remplissage ventriculaire) ; Onde e' : caractérise la vitesse de déplacement du muscle cardiaque au niveau de la paroi latérale de la valve mitrale. E/e' : indice de vitesse tissulaire (indice de pression de remplissage du VG). Les données sont exprimées avec la moyenne \pm ESM. Significativement différent du groupe témoin du même âge et du même sexe : * : p<0,05 ; *** : p<0,001. Significativement différent du même groupe et du sexe opposé : \$: p<0,05 ; \$\$: p<0,01 ; \$\$\$: p<0,001.....	115
--	------------

Table 1: Forward and reverse sequences of primers used for the amplification of mouse genes	96
--	-----------

Table 2: Echocardiographic parameters from postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4, 6 and 12 months of age. Acquisition were made using the VEVO 770 imaging system (Visualsonics) with a 30 MHz probe. LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction; LVIDd: Left Ventricular Internal Diameters diastolic; E: early diastolic transmitral flow velocities; A: late diastolic transmitral flow velocities; e': peak early-diastolic annular velocities. P was calculated by One-way ANOVA test, *: p<0.05, **p<0.01; ****: p<0.001: significantly different from NF group.	97
--	-----------

Table 3: Circulating plasma concentration of Activin A, IL-6 and GDF-15 in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice, 24 hours after in vivo myocardial ischemia reperfusion. Results are obtained in thawed mice plasma. The amount of TNF-α and IL-1β were undetectable (not shown). P was calculated by One-way ANOVA test, *: p<0.05: significantly different from NF group; #: p<0.05, 12 months different to 4 months in the same group.	98
---	-----------

Liste des abréviations

AAR : Aire à risque
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AG : Acide gras
AGRT : Agouti related transcript
AIF : Apoptosis inducing factor
ANP : Atrial natriuretic peptide
ARN : Acide ribonucléique
ARNi : ARN interférent
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ASC : Aires sous la courbe
ATP : Adénosine tri phosphate
AVC : Accident vasculaire cérébral
BAT : Brown adipose tissue (Tissu adipeux brun)
BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BNP : Brain natriuretic peptide
Ca²⁺ : Ion calcium
Ca²⁺-ATPase : pompe calcique dépendante de l'ATP
CART : Cocain and amphetamine related transcript
CCK : Cholécystokinine
CRH : Corticolibérine
CRM : Chaîne respiratoire mitochondriale
CV : Cardiovasculaire
DAG : Diacylglycerol
DOHaD : Developmental Origins of Health and Diseases
DT2 : Diabète de type 2
ECG : Electrocardiogramme
ELISA : Dosage d'immuno-absorption enzymatique
eNOS : NO synthase endothéliale
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ER α : Récepteurs aux œstrogènes α
ER β : Récepteurs aux œstrogènes β

ESM : Erreur standard à la moyenne
ET-1 : Endothéline-1
FA : Fibrillation atriale
FEVG : Fraction d'éjection du ventricule gauche
FR : Fraction de raccourcissement
GDF-15 : Growth differentiation factor 15
GLP-1 : Glucagon-like peptide 1
GLUT : Glucose transporter
GOAT : Ghrelin O-acyl transferase
GPx : Glutathion peroxydase
GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β : Glycogen synthase kinase
H⁺ : Proton
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HDL : High density lipoprotein
HFpEF : Heart failure with preserved ejection fraction
HPLC : High performance liquid chromatography
HTA : Hypertension artérielle
HTVG : Hypertrophie ventriculaire gauche
IC : Insuffisance cardiaque
ICEV : Ischémie cardiaque *ex vivo*
IDF : International Diabetes Federation
IDM : Infarctus du myocarde
IL-1 β : Interleukine 1 beta
IL-10 : Interleukine 10
IL-6 : Interleukine 6
IL-8 : Interleukine 8
IM : Imagerie par résonance magnétique
IMC : Indice de masse corporelle
Ip : Intrapéritonéal
ipGTT : Intra peritoneal glucose tolerance test
ipITT : Intra peritoneal insulin tolerance test
I-R : Ischémie reperfusion
IRS : insulin receptor substrate

IVA : Artère coronaire interventriculaire antérieure
JAK : Janus Kinase
K⁺ : Ion potassique
kDa : Kilo Dalton
LC-MS : Liquid chromatography – mass spectrometry
LDL : Low density lipoprotein
LVEDD : Left ventricular end diastolic diameter
LVESD : Left ventricular end systolic diameter
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCV : Maladies cardiovasculaires
MHz : Mégahertz
MMP-2 : Métalloprotéinase de type 2
MnSOD : Manganèse superoxyde dismutase
mPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondriale
NA : Normo alimenté
Na⁺ : Ion sodium
NCX : Echangeur Na⁺ /Ca²⁺
NHE : Echangeur Na⁺ /H⁺
NO : Monoxyde d'azote
NPY : Neuropeptide Y
OMS : Organisation mondiale de la santé
PA : Pression artérielle
PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
PC : Poids corporel
PCR : Polymérase chain reaction
PDH : pyruvate déshydrogénase
PDHK-1 : Pyruvate déshydrogénase kinase-1
pH : Potentiel hydrogène
PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol 4-5 bi phosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol 3-4-5 bi phosphate
PKB : Protéine kinase B
PKC : Protéine kinase C
PMT : Tube photomultiplicateur

POMC : Pro-opio-mélanocortine
PYY : Peptide YY
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RyR-2 : Récepteurs à la ryanodine
RZ : Remote zone
SAPN : Suralimentation postnatale / Suralimenté postnatalement
SHC : Src homologous and collagen protein
SNC : Système nerveux central
SOS : Son of sevenless
SRA : Système rénine angiotensine
TA : Tissu adipeux
TAE : Tissu adipeux épicardique
TAP : Tissu adipeux péricardique
TG : Triglycérides
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TI : Taille de l'infarctus
TNFR-1 : Récepteur 1 du TNF
TNFR2 : Récepteur du TNF- α
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TRH : Thyrolibérine
TTC : Chlorure de Triphényl Tétrazolium
VCAM-1 : Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1
VD : Ventricule droit
VG : Ventricule gauche
WAT : White adipose tissue (tissu adipeux blanc)
 α -MSH : Alpha melanocyte stimulating hormone

INTRODUCTION GÉNÉRALE

A/ Surpoids et obésité

I/ Définitions

A l'heure actuelle, 2 milliards d'adultes sont en surpoids et plus de la moitié sont obèses. Le surpoids et l'obésité représentent donc un problème mondial de santé publique, avec une prévalence en constante augmentation. Les enfants ne sont pas épargnés par ces maladies métaboliques, car un enfant sur trois dans le monde connaît une croissance et un développement médiocre à cause de la malnutrition [1]. En Europe, 8% des enfants de moins de cinq ans et un enfant scolarisé sur trois est en surpoids ou souffre d'obésité [2].

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le surpoids et l'obésité se définissent par un excès de masse grasse corporelle pouvant être délétère pour la santé. L'outil le plus couramment utilisé chez l'Homme adulte pour évaluer la masse grasse d'un individu et ses risques est l'indice de masse corporelle (IMC). Il correspond au rapport du poids sur la taille au carré et est exprimé en kg/m^2 . Son interprétation est réalisée comme suit :

- $\text{IMC} < 16,5$: dénutrition ou famine
- $16,5 < \text{IMC} < 18,5$: maigreur
- $18,5 < \text{IMC} < 25$: corpulence normale
- $25 \leq \text{IMC} < 30$: surpoids
- $30 \leq \text{IMC} < 35$: obésité modérée
- $35 \leq \text{IMC} < 40$: obésité sévère
- $40 \leq \text{IMC}$: obésité massive

Cet indice est très largement utilisé car il est constant entre les individus présentant les mêmes caractéristiques d'âge, de sexe et de corpulence. Cependant, il est critiqué car il ne prend pas en compte les différentes masses (musculaires et adipeuses) qui composent le corps et leur distribution. En effet, deux patients avec un IMC identique peuvent avoir des complications liées à l'obésité différentes en fonction de la distribution de leur excès de masse adipeuse : ainsi, les graisses viscérales et ectopiques ont un impact plus délétère sur la survenue de maladies cardiovasculaires que l'excès de graisse sous-cutanée. [3]. L'utilisation d'index moins communs comme le tour de taille, le rapport taille-hanche et le rapport poids/hauteur permettrait d'avoir une approche prédictive plus performante de l'apparition de ces maladies [4-6]. L'obésité et le surpoids sont souvent associés au risque de développer

d'autres pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (maladies vasculaires cérébrales et coronariennes, hypertension, insuffisance cardiaque...), métaboliques (diabète, dyslipidémie, stéatose hépatique), psychologiques (dépression et anxiété)[7], respiratoires (apnée du sommeil et infections bactériennes et virales)[8], infertilité (hypogonadisme, maladie des ovaires polykystiques et complications de grossesse) et certains types de cancer [9-12]. En outre, l'obésité est associée à plus de 2,8 millions de décès par an dans le monde et l'espérance de vie est réduite de 8 à 10 ans chez les sujets obèses par rapport à ceux de poids normal. De plus, la mortalité cardiovasculaire est 50% plus élevée chez les patients obèses et 90% plus élevée chez les patients présentant une obésité massive [13]. Au-delà de la théorie simpliste selon laquelle l'obésité serait uniquement induite par un déséquilibre énergétique entre les calories ingérées et celles dépensées, il existe des mécanismes physiopathologiques complexes et de nombreux facteurs de risque qui participent à la mise en place progressive de l'obésité.

II/ Facteurs de risques du surpoids et de l'obésité

Les facteurs de risque et origines du surpoids et de l'obésité sont multiples et leur identification représente un enjeu de recherche majeur.

1/ Facteurs génétiques

La composante génétique représente une part importante des facteurs de risque du surpoids ou de l'obésité. En effet, la prévalence de l'obésité est environ 4 fois plus élevée au sein de familles d'individus obèses que dans l'ensemble de la population [14]. A ce jour, plus de 60 marqueurs génétiques relativement courants sont associés à une susceptibilité élevée à l'obésité [15, 16]. Cependant, la présence de ces allèles dits « obésogènes » n'est pas forcément en cohérence avec l'IMC, car lorsque 32 des variants génétiques « supérieurs » sont combinés en un score de risque de l'obésité (risque le plus élevé lorsque 38 allèles à risque sont présents dans le génome de l'individu), l'IMC varie de 2,7 kg/m² par rapport à un individu à faible risque d'obésité, ce qui se traduit par une augmentation du poids corporel (PC) de 7 kg pour un individu de 160 cm [15]. Au vu de ces résultats, il est indéniable que la génétique n'est pas le seul facteur de risque impliqué dans le développement de l'obésité. Ainsi, d'autres hypothèses font le lien entre l'environnement d'un individu et son patrimoine génomique,

sous le terme de facteurs « nutri-génétiques » qui favorisent chez leurs hôtes le stockage de calories sous forme de graisse corporelle [17].

2/ Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux, qui sont considérés comme modifiables, jouent un rôle prépondérant dans la survenue du surpoids et de l'obésité. Ainsi, le rôle de l'équilibre entre l'alimentation et l'activité physique n'est plus à démontrer à ce jour. Dans les années 2000, 15% des décès aux États-Unis étaient imputables à un excès pondéral lié à un déficit d'activité physique et à une mauvaise alimentation [18]. Au-delà de travaux sur l'impact de l'apport calorique global, de nombreuses recherches ont porté sur le rôle de la qualité nutritionnelle et des habitudes alimentaires [19]. A la suite de la deuxième guerre mondiale, l'essor économique des pays industrialisés a été accompagné de grands bouleversements d'habitudes alimentaires, dans lesquels les industries agro-alimentaires ont joué un rôle majeur, notamment en mettant à la disposition des consommateurs des produits enrichis en hydrates de carbone, comme les sodas et/ou en graisses, et d'apport calorique important. Ainsi, l'obésité a vu sa prévalence augmenter parallèlement à leur consommation [20]. En outre, la diminution du niveau d'activité physique dans ces populations a joué un rôle aggravateur, ne pouvant contrebalancer une alimentation toujours plus riche et calorique. D'autres éléments que l'augmentation de la sédentarité jouent aussi un rôle clef pour le maintien du PC, tels que le sommeil, le stress ou encore le statut hormonal [21]. Associés à l'alimentation, ces différents éléments présentent des effets synergiques et probablement cumulatifs sur la capacité d'un individu à atteindre ou à maintenir un poids dit de « santé » tout au long de la vie [22].

3/ Facteurs endocriniens

L'obésité peut être considérée comme une maladie neuroendocrinienne car la régulation de la prise alimentaire fait intervenir de nombreux neurotransmetteurs et neurohormones via le système nerveux central (SNC) et plus précisément l'hypothalamus [23] qui constitue le site principal du contrôle de la prise de nourriture et de la satiété [24]. L'hypothalamus est composé d'une douzaine de noyaux dont quatre sont impliqués dans la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire : le noyau arqué, le noyau ventro-médian, le noyau paraventriculaire et le noyau latéral de l'hypothalamus. Ces noyaux

hypothalamiques sont en permanence informés de l'état énergétique de l'organisme par des messages afférents, nerveux ou endocriniens, provenant de nombreux organes comme le pancréas, le système digestif et le tissu adipeux (figure 1). Ces messages afférents stimulent ou réduisent la prise alimentaire : on parle respectivement de messagers orexigènes ou anorexigènes. Deux types de régulations permettent l'ajustement de la prise alimentaire en fonction des signaux perçus par le SNC : la régulation à court terme régie par les hormones gastro-intestinales, ou entérogastrones, qui informent les noyaux hypothalamiques de la satiété suite à un repas ; et la régulation à long terme faisant intervenir la leptine ou encore l'insuline, qui renseignent sur l'état des stocks énergétiques.

La régulation à court terme de la prise alimentaire est initiée par la sécrétion d'entérogastrones telles que le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), la cholécystokinine (CCK) et le peptide YY (PYY). Elles adressent un message de satiété au noyau arqué via l'activation des neurones POMC (pro-opio-mélanocortine) qui produisent en retour de l' α -MSH (alpha melanocyte stimulating hormone) et du CART (le transcrite régulé par la cocaïne et l'amphétamine). Leur fixation sur les récepteurs à la mélanocortine de type 3 et 4 (MC3R et MC4R) sur le noyau paraventriculaire initie la production de différentes neurohormones à composante anorexigènes telles que la corticolibérine (CRH : corticotropin-releasing hormone), la thyrolibérine (TRH), et le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) [25] qui collectivement vont accroître le niveau de dépense énergétique et diminuer la prise de nourriture.

La régulation à plus long terme implique la libération d'autres hormones anorexigènes, telles que l'insuline produite par le pancréas et la leptine par le tissu adipeux dont les niveaux augmentent après les repas [26]. Ces deux hormones se fixent sur leurs récepteurs spécifiques présents dans le noyau arqué, entraînant l'inhibition de l'expression du NPY (neuropeptide Y) orexigène, et l'activation de celle de la POMC [26, 27], anorexigène, l'ensemble de ces processus aboutissant à la diminution de la prise alimentaire.

A l'inverse, en période interprandiale ou de jeûne, la production par l'estomac de la ghréline, seule hormone circulante à potentiel orexigène, permet d'initier la prise alimentaire. L'activité de la ghréline nécessite son acylation par la GOAT (Ghrelin O-acyl transferase) [28]. L'acyl-ghréline active les neurones NPY/AgRP au niveau des noyaux arqués, dorso et ventro-

médians, qui vont inhiber la liaison de l' α -MSH sur les récepteurs MC3-R et MC4-R aboutissant à l'inhibition de la signalisation anorexigène et favorisant ainsi la prise alimentaire.

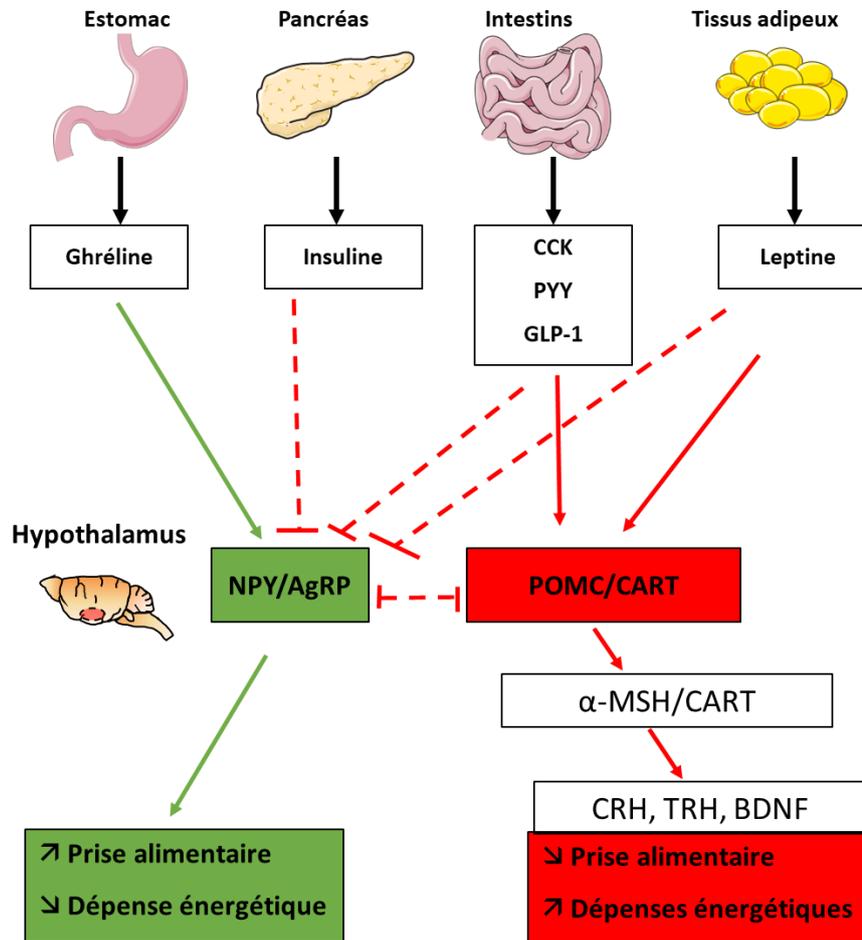


Figure 1 : Mécanismes de régulation de la prise alimentaire. NPY : neuropeptide Y, AgRP : agouti related peptide, POMC : pro-opiomélanocortine ; CART : cocain and amphetamine related transcript ; CCK : cholécystokinine ; PYY : peptide YY ; GLP-1 : glucagon like peptide ; α -MSH : alpha melanocyte stimulating hormone ; CRH : corticolibérine ; TRH : thyrolibérine ; BDNF : brain derived natriuretic peptide [29].

Toute dérégulation de ces voies de signalisations en faveur d'une hausse ou d'une diminution de sécrétion de ces hormones entraîne des perturbations de la prise alimentaire, conduisant à une augmentation du PC pouvant mener à un surpoids ou une obésité si ces dérégulations hormonales persistent dans le temps [30, 31].

4/ Facteurs environnementaux et endocriniens précoces

Comme nous le développerons ultérieurement dans un chapitre dédié, des expositions à des événements environnementaux précoces de la vie, de la période conceptionnelle à la

période postnatale, d'ordre nutritionnels, endocriniens ou physiques, ont une importance non négligeable dans l'orientation pondérale des individus. L'influence de l'alimentation maternelle pendant la gestation sur la survenue de l'obésité chez des enfants a été étudiée à la fois chez l'Homme [32, 33] et dans des modèles expérimentaux [34-36].

Ainsi, de nombreux facteurs gouvernent de manière coordonnée les mécanismes de régulation de la prise alimentaire et de la satiété, afin d'établir un équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Des dérégulations de ces facteurs peuvent aboutir à un ensemble de comorbidités métaboliques et cardiovasculaires (CV). Accéder à une meilleure compréhension des causes et des mécanismes biologiques conduisant à l'obésité est aujourd'hui un des grands enjeux de la Recherche. Comme toutes les maladies chroniques, l'obésité devient pratiquement irréversible lorsqu'elle est installée ; ainsi, prévenir son développement est donc primordial si l'on veut enrayer son caractère endémique.

III/ Complications cardio-métaboliques du surpoids et de l'obésité

Le surpoids et l'obésité sont impliqués dans un grand nombre de pathologies, toutefois, nous n'évoquerons ici que leurs conséquences CV et métaboliques.

1/ Complications cardiovasculaires du surpoids et de l'obésité

Chez le sujet obèse, le tissu adipeux (TA) joue un rôle déterminant dans la mise en place d'une dysfonction endothéliale [37] et d'atteintes coronaires [38]. L'augmentation du nombre et du volume des dépôts de graisse périvasculaire conduit à une sécrétion accrue de cytokines pro inflammatoires qui jouent un rôle paracrine favorisant le développement local de l'athérosclérose [39]. L'athérosclérose est une pathologie métabolique et inflammatoire des artères (figure 2), initiée par la pénétration de lipoprotéines athérogènes, en particulier les LDL (low density lipoprotein), à travers la monocouche de cellules endothéliales. Une fois dans l'espace sous intimal, les LDL vont être oxydées induisant l'activation de l'endothélium et favorisant l'expression de molécules d'adhérence pour les leucocytes, permettant la pénétration de monocytes circulants dans l'intima. Les monocytes sont ensuite activés en macrophages et renforcent l'oxydation des LDL qui vont être reconnus par leurs récepteurs

scavengers de classe A [40]. Les macrophages phagocytent les LDL oxydés, mais deviennent progressivement spumeux, constituant les stries lipidiques, premières lésions de l'athérosclérose [41]. L'extension de ces stries lipidiques tend à être limitée par les cellules musculaires lisses de la média, qui migrent dans l'intima, perdent leur phénotype musculaire et sécrètent du collagène au cours d'une réaction cicatricielle. La stabilité de la plaque d'athérome dépend ainsi du niveau d'inflammation et de la solidité de la chape fibromusculaire ainsi formée [42, 43]. L'érosion ou la rupture de ces plaques, favorisée par l'inflammation chronique et certains facteurs aujourd'hui peu connus, conduit à l'athéromatose [44] qui, en obstruant une artère coronaire, induit la survenue d'un syndrome coronaire aigu qui sera suivi d'un infarctus du myocarde (IDM) et/ou pourra mener à la mort subite [45].

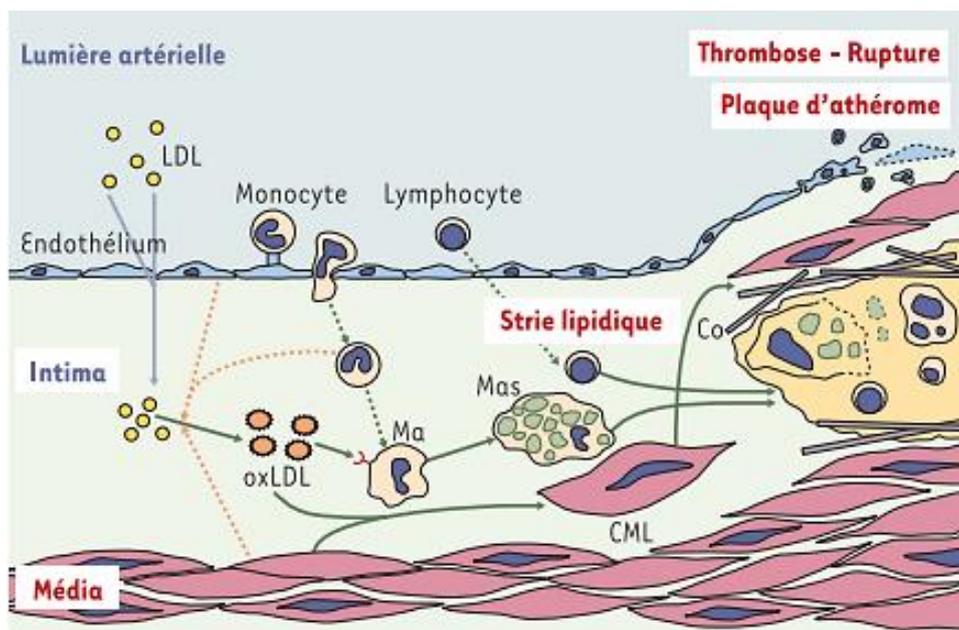


Figure 2 : Mécanismes de l'athérosclérose [41]. LDL : lipoprotéine de faible densité ; Ma : macrophage ; Mas : macrophages spumeux ; CML : cellule musculaire lisse ; Co : collagène.

À la mesure du développement excessif du TA, la structure et la fonction cardiaque de l'individu subissent une série d'adaptations et de changements. Chez les personnes obèses (figure 3), l'évolution du PC engendre une augmentation du volume sanguin circulant conduisant à une élévation du débit cardiaque par augmentation du volume d'éjection

systolique sans modification de la fréquence cardiaque. L'augmentation du débit cardiaque génère une augmentation des résistances vasculaires systémiques et une hausse du retour veineux. Sous l'augmentation de ces contraintes hémodynamiques, le ventricule gauche (VG) se dilate et il s'hypertrophie parallèlement de façon excentrique [46, 47]. Si l'hypertrophie du VG suit le rythme de la dilatation (situation d'hypertrophie adéquate), alors la contrainte pariétale se normalisera, et la fonction systolique du VG restera préservée ; toutefois, les patients pourront développer une dysfonction diastolique [48]. A l'inverse, si l'hypertrophie ne parvient pas à suivre le rythme de la dilatation du VG (on parle d'hypertrophie inadéquate), la contrainte pariétale sur le VG restera élevée et les fonctions systolique et diastolique du VG seront altérées, conduisant au développement d'une insuffisance cardiaque ventriculaire gauche [49]. Cette insuffisance fonctionnelle du cœur gauche peut avoir des répercussions directes sur le cœur droit, car l'augmentation de la pression atriale gauche contribue à une hypertension veineuse pulmonaire, à une élévation de la pression sanguine capillaire et éventuellement à une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Parallèlement, l'obésité est fréquemment associée à un syndrome d'apnée obstructive du sommeil, qui conduit à des hypoxies intermittentes, facteurs de risque et d'aggravation de l'HTA systémique mais aussi pulmonaire. En réponse à l'HTA, le ventricule droit (VD) se dilate puis s'hypertrophie pouvant induire une insuffisance ventriculaire droite. Ces anomalies structurales ventriculaires prédisposent le cœur des sujets obèses aux arythmies ventriculaires, responsables de plus de 80% des décès par mort subite cardiaque [23].

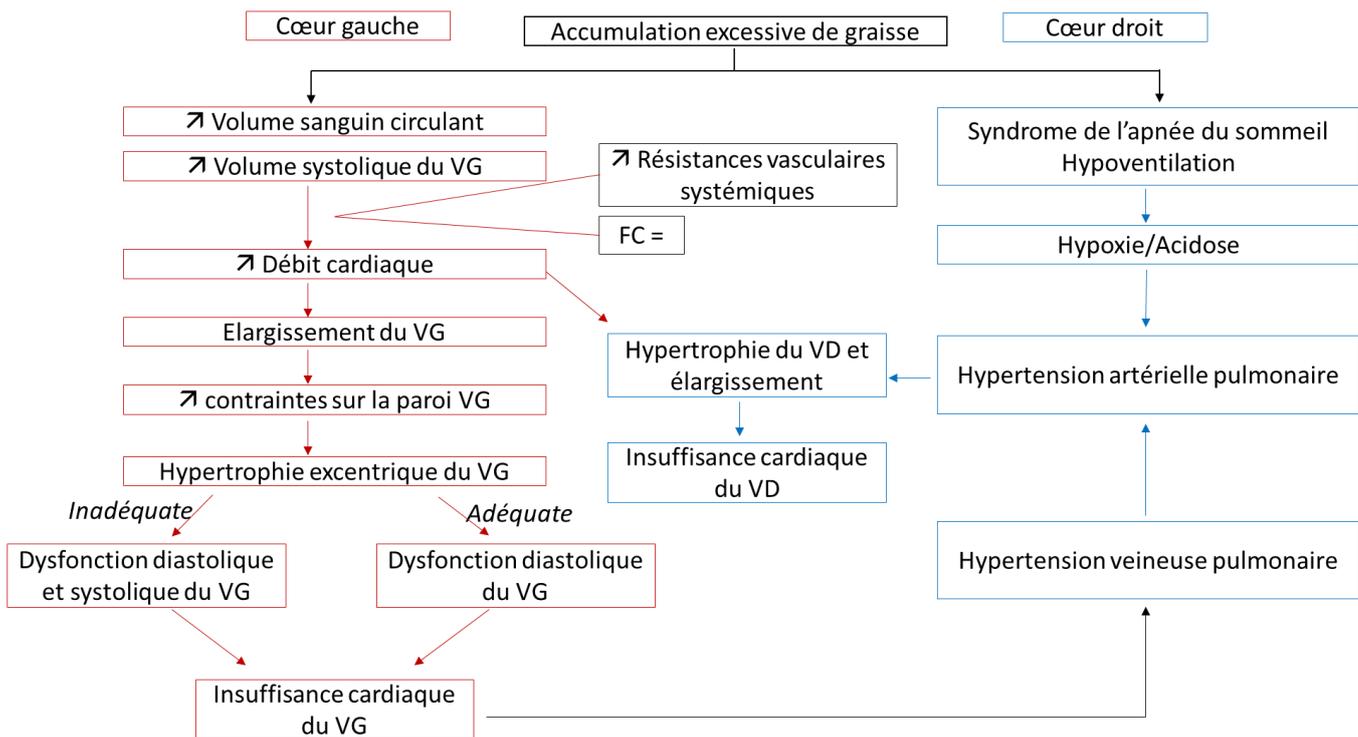


Figure 3 : Physiopathologie de la cardiomyopathie induite par l'obésité. Adaptée de la publication de Alpert et al, 2001 [23]. FC : fréquence cardiaque, VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit.

Par ailleurs, l'étude de Framingham a montré que chaque point d'augmentation de l'IMC entraîne une hausse de 4% du risque ischémique cardiaque, de 6% du risque d'accident vasculaire cérébraux (AVC) hémorragiques, et de 5% et 7% du risque d'insuffisance cardiaque (IC) chez l'homme et la femme respectivement [50, 51].

Enfin, on parle de « cardiomyopathie de l'obèse » lorsque ces atteintes cardiaques évoluent depuis de nombreuses années et sont associées à un IMC supérieur à 35. Les principales causes de décès chez les personnes atteintes de cardiomyopathie obèse sont l'insuffisance cardiaque congestive et la mort subite d'origine cardiaque et sont majoritairement précédées d'arythmies cardiaques [52]. Des études *post mortem* chez des sujets obèses ont mis en évidence au niveau des nœuds sinusal et auriculo ventriculaire mais également au niveau du tissu ventriculaire, la présence d'infiltrat graisseux et une fibrose, favorisant les arythmies atriales et ventriculaires [53, 54].

2/ Conséquences métaboliques du surpoids et de l'obésité

Qu'ils soient dus à des facteurs d'ordre génétiques ou environnementaux, le surpoids et l'obésité sont très souvent associés à des anomalies métaboliques telles que la dyslipidémie et l'insulino-résistance.

(a) Dyslipidémie

Une dyslipidémie repose sur l'exploration d'une anomalie lipidique pratiquée en période de jeûne, et se caractérise par la présence de perturbations quantitatives et qualitatives des lipides circulants. Le bilan lipidique tient compte des concentrations de cholestérol total, de triglycérides (TG), de lipoprotéines de haute densité (high density lipoprotein : HDL-cholestérol) et de lipoprotéines de faible densité (low density lipoprotein : LDL-cholestérol). Ces deux lipoprotéines participent au transport du cholestérol dans des sens opposés. Les HDL natives captent le cholestérol au niveau des tissus afin de former des complexes HDL-cholestérols qui cheminent vers le foie pour permettre son élimination. A l'inverse, les LDL-cholestérols apportent le cholestérol aux tissus périphériques. Les recommandations récentes de prise en charge des patients stipulent de prendre en compte le risque CV global du patient pour dépister une dyslipidémie. En l'absence de risque CV, on parle de dyslipidémie lorsque :

- les taux de LDL-cholestérol $\geq 1,6$ g/l et/ou de TG $\geq 1,50$ g/l à deux reprises
- le taux de triglycérides ≥ 5 g/l à deux reprises

Chez les patients à risque CV, la dyslipidémie est avérée lorsque :

- le taux de LDL-cholestérol $\geq 1,3$ g/l à deux reprises et le taux de TG $< 1,50$ g/l
- les taux de LDL-cholestérol $< 1,3$ g/l et de TG $\geq 1,50$ g/l à deux reprises
- les taux de LDL-cholestérol $\geq 1,3$ g/l à deux reprises et le taux de TG $\geq 1,50$ g/l à deux reprises

L'effet de la prise de poids sur la lipidémie se traduit par une élévation des taux de triglycérides et de LDL-cholestérol, associée à une baisse du cholestérol contenu dans les HDL [55-57]. Aujourd'hui, le ratio cholestérol total/HDL-cholestérol apparaît comme étant un

facteur prédictif robuste quant à la survenue de maladies CV [58, 59]. Il est intéressant de noter que ce rapport, appelé également indice d'athérogénicité, augmente avec l'IMC [60] alors que, le cholestérol total, quant à lui, tend vers un plateau au-delà d'un IMC de 30.

Parallèlement au développement de la dyslipidémie, en réponse à l'accumulation excessive de graisse, l'organisme du sujet obèse développe une inflammation chronique reliée à une libération accrue de cytokines pro inflammatoires par les adipocytes. Ces adipocytokines telles que l'interleukine 1 β , l'interleukine-6 et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), peuvent altérer les parois vasculaires en induisant une dysfonction endothéliale [37] et en accélérant le développement de l'athérosclérose [39].

(b) Insulino-résistance et diabète

Chez l'individu sain, le taux sanguin de glucose est maintenu stable, bien qu'il varie au cours de la journée entre les périodes postprandiales et de jeûne. Le maintien de la glycémie dans des valeurs physiologiques est un processus crucial au bon fonctionnement de l'organisme, nécessitant une régulation fine par deux hormones : l'insuline et le glucagon. L'insuline est une hormone hypoglycémisante, qui favorise l'entrée et le stockage du glucose dans les cellules à la suite d'une élévation de la glycémie, alors que le glucagon est une hormone hyperglycémisante, qui en période de jeûne favorise la libération hépatique du glucose dans le sang. L'insulinorésistance est un état métabolique qui se caractérise par une baisse de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline, principalement au niveau du muscle strié squelettique, du foie et du TA. Cette altération métabolique précède le plus souvent le diabète de type II (DT2), qui se développe plus fréquemment chez les sujets en surpoids [61, 62]. L'insulinorésistance se caractérise par la mise en place d'une hyperglycémie très délétère pour l'organisme et responsable de nombreuses complications, dont des complications cardio-vasculaires, regroupées sous le terme de « glucotoxicité ». L'hyperglycémie est initialement associée à un hyperinsulinisme qui permet dans un premier temps d'assurer la tolérance au glucose. Au cours du temps, ce mécanisme adaptatif tend à se décompenser, ce qui va conduire à une augmentation progressive de la sécrétion d'insuline, puis, à terme, à une baisse de cette réponse compensatoire par épuisement des cellules bêta-pancréatiques chargées de sa production.

Le DT2 est une pathologie caractérisée par une altération de la glycorégulation qui se manifeste par une hyperglycémie à jeun ($> 1,26$ g/L à deux reprises) et post-prandiale (> 2 g/L deux heures après le repas) malgré la présence d'insuline produite par un pancréas initialement fonctionnel. Le DT2 est le type majoritaire de diabète, sa prévalence est en forte augmentation, notamment chez les jeunes, et elle est corrélée à l'augmentation de la fréquence de la cardiomyopathie diabétique, qui altère le métabolisme énergétique cardiaque. Physiologiquement, le cœur présente une importante flexibilité métabolique, c'est-à-dire une capacité à utiliser les substrats disponibles en fonction de leur abondance. En condition normale interprandiale, l'énergie cardiaque provient à 60-90% de la β -oxydation mitochondriale des AG qui produit de l'ATP en quantité suffisante pour assurer la contraction cardiaque [63]. En état postprandial, quand la glycémie et l'insulinémie sont élevées, un changement métabolique se produit : l'insuline induit la translocation membranaire de GLUT4 (glucose transporter 4) et l'activation de la pyruvate déshydrogénase (PDH), favorisant la captation du glucose et son utilisation pour la glycolyse et la production d'ATP par le cycle de Krebs [64]. L'une des caractéristiques de la cardiomyopathie diabétique réside dans la perte de la flexibilité métabolique, avec une diminution de l'utilisation du glucose et une plus grande dépendance vis-à-vis des AG [65]. En effet, dans un contexte pathologique d'obésité ou de diabète, où les niveaux d'AG circulants sont élevés, il a été démontré un déséquilibre entre l'internalisation des AG et leur oxydation, créant des gouttelettes lipidiques au sein du myocarde ainsi qu'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [66, 67]. Les ROS, comme l'anion superoxyde (O_2^-) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont des molécules dérivées de l'oxygène formées lors de processus physiologiques tels que la respiration mitochondriale. Les ROS agissent comme seconds messagers dans de nombreuses fonctions régulatrices : fonctionnement cellulaire, système immunitaire, autophagie, régulation du flux sanguin artériel, synthèse des hormones thyroïdiennes [68, 69]. L'excès de ROS entraîne un stress oxydant qui participe au développement (1) d'une dysfonction mitochondriale [66, 67] et (2) d'une résistance à l'insuline par inactivation des IRS (insulin receptor substrate) via la phosphorylation de leurs résidus sérine/thréonine par la protéine kinase C [70], réduisant la pénétration intracellulaire du glucose [71, 72]. En condition physiologique (figure 4A), la fixation de l'insuline sur son récepteur et l'activation de son substrat l'IRS-1 induit une cascade de phosphorylations [73] débutant par celle de PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) qui phosphoryle à son tour PDK-1 (pyruvate déshydrogénase

kinase-1) par l'intermédiaire de PIP2 (phosphatidylinositol 4-5 biphosphate) et PIP 3 (phosphatidylinositol 3-4-5 triphosphate). Une fois activé, PDK-1 phosphoryle Akt (protéine kinase B) qui active la NO synthase de type endothélial (eNOS/NOS3) induisant la production de NO et ainsi le phénomène de vasodilatation entraînant une augmentation du flux sanguin et la captation musculaire du glucose. En condition pathologique (figure 4B) comme un DT2 ou une obésité, les cellules endothéliales sont exposées à une hyperglycémie, à une augmentation des taux d'acides gras libre (AGL) ou encore à une inflammation, induisant une altération de l'activation de Akt et eNOS par l'insuline [74]. L'hyperglycémie favorise par ailleurs la voie des MAPK, qui peut conduire à la production d'endothéline 1, puissamment vasoconstrictrice.

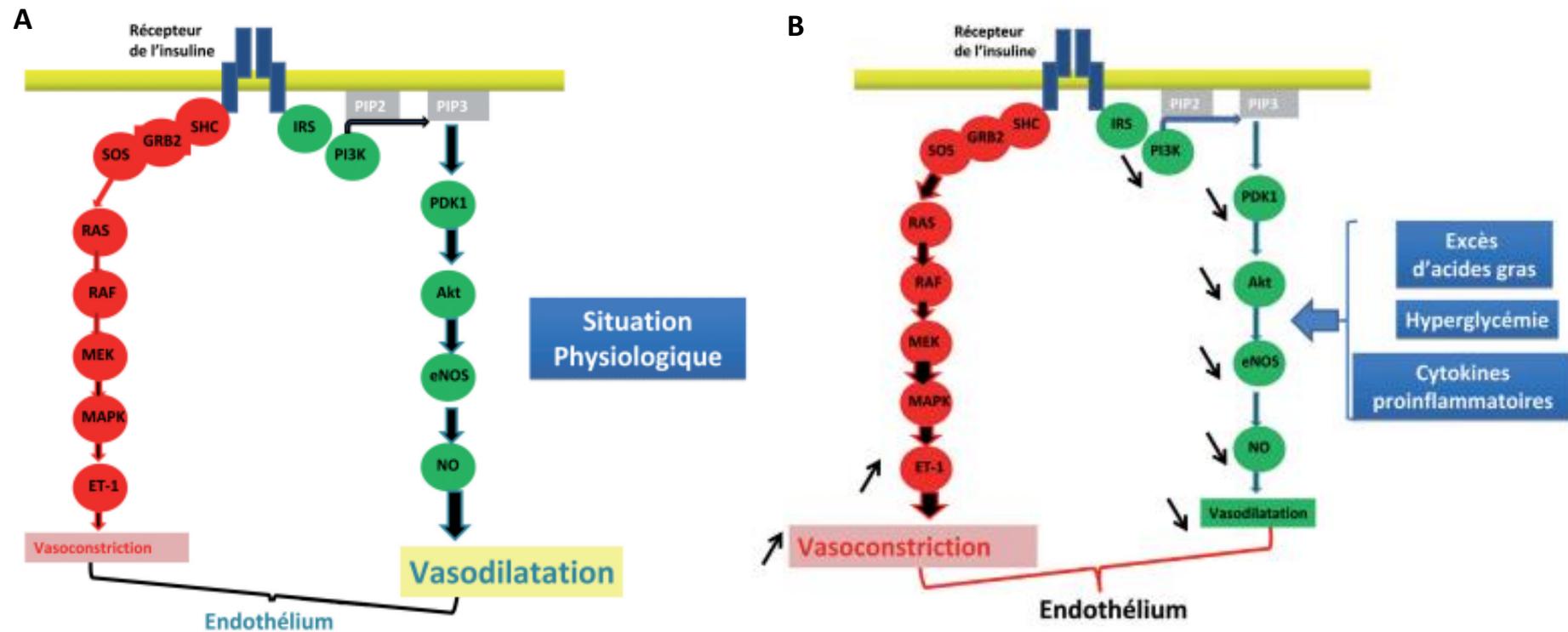


Figure 4 : Voies de signalisation endothéliales impliquées dans la régulation du tonus vasculaire par l'insuline, en situation physiologique (A) ou pathologique (B) [75]. SHC : src homologous and collagen protein ; GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2 ; SOS : son of sevenless ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; MAPK : mitogen-activated protein kinases ; ET-1 : endothelin-1 ; IRS : insulin receptor substrate ; PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase ; PDK1 : 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 ; PIP2 : phosphatidylinositol 4-5 bi phosphate ; PIP3 : phosphatidylinositol 3-4-5 tri phosphate ; Akt : Protein kinase B. eNOS : NO synthase endothéliale ; NO : monoxyde d'azote.

L'ensemble de ces dysfonctions cardiaques et métaboliques induites par le surpoids et l'obésité converge vers le développement d'une cardiomyopathie diabétique, principale cause de morbi-mortalité des patients diabétiques [76]. En effet, le cœur du patient diabétique présente une fonction diastolique diminuée, une hypertrophie ventriculaire gauche (HTVG) avec une fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) conservée et parfois une altération de sa fonction systolique [77]. *In fine*, le diabète favorise l'installation d'une insuffisance cardiaque, qu'il s'agisse de patients déjà hospitalisés pour IDM, ou de ceux présentant une HTA ou une fibrillation atriale (FA) [78]. En outre, on constate une dérégulation de la glycémie deux fois plus fréquente chez les patients atteints d'infarctus du myocarde par rapport à la population « saine » [79, 80].

Ces éléments montrent que l'augmentation de l'adiposité induite par une surcharge pondérale, joue un rôle prépondérant dans les dysfonctions CV et métaboliques, plus ou moins fréquentes selon le degré de surpoids et d'obésité [81]. Une baisse même modérée de la masse adipeuse permettrait de rétablir un profil métabolique se rapprochant des valeurs physiologiques [82].

3/ Paradoxe de l'obésité

Alors que dans la population générale l'obésité est associée à une plus grande mortalité totale, attribuée essentiellement à la mortalité CV qu'elle engendre, chez l'insuffisant cardiaque, la présence d'une obésité ou d'un surpoids ne serait pas un élément défavorable. Non seulement une augmentation de l'indice de masse corporelle n'est pas corrélée à une surmortalité, mais elle tendrait à être associée à un meilleur pronostic [83, 84]. De même, dans le cadre de l'HTA, des patients hypertendus obèses peuvent présenter un meilleur pronostic par rapport à leurs homologues plus maigres [85]. Bien que les raisons ne soient pas clairement déterminées, cet effet paradoxal pourrait être lié à des résistances vasculaires systémiques moins importantes et à une activité rénine plasmatique plus faible [86].

Certains auteurs suggèrent enfin que le paradoxe de l'obésité caractériserait plus particulièrement les patients ayant une mauvaise condition physique, et ne concernerait pas ceux présentant une meilleure forme physique et dont le pronostic est meilleur [87].

4/ Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique, dont la prévalence est en hausse [88-92], est un syndrome chronique non infectieux caractérisé cliniquement par un ensemble de facteurs de risque vasculaires comprenant : la résistance à l'insuline, l'hypertension, l'obésité abdominale, une altération du métabolisme du glucose et la dyslipidémie. La définition du syndrome métabolique la plus couramment utilisée en Europe reste celle de l'IDF (International Diabetes Federation) datant de 2004 : le syndrome métabolique est défini par la présence d'au moins trois de ces cinq facteurs, avec le tour de taille comme facteur principal :

- Obésité abdominale (facteur principal) : tour de taille > 94 cm pour les hommes et 80 cm pour les femmes en Europe. Toutefois pour la population américaine, les valeurs sont plus élevées : > 102 cm pour les hommes et 88 cm pour les femmes.

- Glycémie à jeun > 5,5 mmol/l (1 g/l)

- Triglycéridémie > 1,50 g/l

- HDL cholestérol < 0,4 g/l pour l'homme et 0,5 g/l pour la femme

- Pression artérielle (PA) systolique > 130 mmHg et pression artérielle diastolique > 85 mmHg.

Ces facteurs de risque peuvent être mis en lien avec : (1) un état pro-inflammatoire chronique dit de bas grade, caractérisé par une hausse des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires, principalement l'interleukine 1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) provenant notamment comme nous l'avons déjà vu, du tissu adipeux des individus en surpoids ou souffrant d'obésité [93] ; (2) un stress oxydant tissulaire et circulant ; (3) un dysfonctionnement hémodynamique avec une augmentation de la PA et à (4) une ischémie cardiaque caractérisée par des taux élevés de troponine i cardiaque [94]. Le syndrome métabolique est donc étroitement lié à la présence d'un surpoids ou d'une obésité, mais surtout d'une insulino-résistance qui précède ou succède à un diabète [95].

5/ Inégalités liées au sexe

Le dimorphisme sexuel décrit les différences biologiques entre les hommes et les femmes, déterminées par des disparités au niveau des chromosomes et des hormones sexuelles que sont la testostérone, les œstrogènes et la progestérone, ainsi que de leurs effets sur l'organisme. Les hormones sexuelles vont ainsi influencer de nombreux processus cellulaires (métabolisme énergétique, composition corporelle, fonction vasculaire, réponse inflammatoire) en modulant l'expression de gènes et de protéines [96]. Chez l'homme, la testostérone est la principale hormone sexuelle masculine alors que chez la femme, l'estradiol est la forme majoritaire et la plus active des hormones sexuelles féminines. Il est de nos jours largement établi que les femmes âgées de 35 à 65 ans bénéficient d'une protection oestrogénique face aux MCV réduisant ainsi le risque CV des femmes par rapport à celui des hommes du même âge [97]. Cependant, ce risque cardiovasculaire tend à rejoindre celui des hommes à la ménopause, où la production des hormones sexuelles par les ovaires est stoppée, réduisant considérablement leurs effets protecteurs [98]. On observe ainsi que dans la population jeune, l'hypertension touche plus particulièrement les hommes que les femmes, alors que le pourcentage double chez les femmes d'âge mûr par rapport aux hommes [99].

De nombreuses études expérimentales ont également souligné les effets protecteurs de l'estradiol sur le système vasculaire : l'estradiol préviendrait la formation des stries lipidiques, premier stade de l'athérosclérose [100] en potentialisant la vasodilatation endothéliale dépendante du NO [101] par l'intermédiaire de l'activation de la voie PI3K/Akt [102]. De plus, d'autres études expérimentales chez le rongeur ont montré que les œstrogènes protègeraient les cardiomyocytes des lésions ischémiques et de reperfusion chez les femelles par rapport aux mâles en i) diminuant la production d'anion superoxyde via l'activation des MnSOD (manganèse superoxyde dismutase) [103], ii) stimulant la phosphorylation et la translocation nucléaire de Akt [104], iii) inhibant la libération du facteur pro-apoptotique Bax [105] et en iv) inhibant la synthèse de collagène réduisant ainsi la fibrose cardiaque [106]. Ces études mettent en lumière les différences significatives entre les sexes en termes de prévalence, de physiopathologie et d'issue des maladies cardiovasculaires (MCV) [107]. On peut facilement imaginer que tout déséquilibre endocrinien favorise un statut cardio-métabolique défavorable, observable chez les femmes présentant un excès d'androgènes ou chez les hommes présentant un hypogonadisme [108].

Enfin, les conditions sociales et la combinaison de facteurs biologiques et environnementaux influencent le développement et l'évolution de l'organisme à chaque stade de la vie, de la programmation foetale au vieillissement, mais influencent également l'apparition de MCV et métaboliques [109]. C'est ainsi que le sexe est un des facteurs inclus dans de plusieurs scores de risque [110, 111]. Pour finir, la répartition de l'excès d'adiposité est également dépendante du sexe : chez la femme, on parle de répartition gynoïde qui est associé à un risque CV faible, contrairement à la répartition androïde de type abdominal, majoritairement observée chez l'homme et associée à un risque CV plus élevé. Il apparaît nécessaire de comprendre les mécanismes d'installation du surpoids et de l'obésité et d'approfondir le rôle crucial du tissu adipeux dans ces pathologies.

B/ Le tissu adipeux : organe au cœur du surpoids et de l'obésité

I/ Définition

Le TA joue un rôle physiologique essentiel dans le maintien de l'homéostasie métabolique. Il est composé pour un tiers de ces cellules d'adipocytes, qui sont spécialisées dans le stockage des triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques et qui constituent une partie des réserves énergétiques de l'organisme. Dans les deux tiers restants, on retrouve des cellules souches, des pré-adipocytes, des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires. Le TA peut être classé en 3 types selon sa morphologie : le TA blanc (WAT), le TA brun (BAT) et le TA beige. Le tissu adipeux blanc (WAT) peut également être classé en fonction de sa localisation : sous cutanée ou viscérale, c'est-à-dire situé à l'intérieur de l'abdomen et autour des reins et des gonades. De par leur morphologie et leur localisation, ces différents TA ont des rôles qui leur sont propres [112].

II/ Le tissu adipeux blanc (WAT)

Les dépôts de TA blancs sous cutané et viscéral ont des rôles très distincts. Le TA sous-cutané se développe afin de stocker et de libérer les lipides sous forme d'acides gras selon les besoins énergétiques de l'organisme et est associé à un faible profil inflammatoire et à une absence d'élévation du risque CV. Le TA viscéral a pour fonction principale d'amortir et de

protéger les viscères (estomac, foie, intestin, rate, reins, ...) et est à l'inverse métaboliquement délétère pour le système CV à cause de son rôle pro-inflammatoire [82].

Les différents types cellulaires qui composent le TA sécrètent de manière coordonnée de nombreuses adipocytokines, chimiokines ou hormones, substances de communication intercellulaire qui transmettent les informations au SNC et à d'autres organes, comme le foie, le cœur ou encore les vaisseaux. Parmi le vaste sécrétome du TA blanc, on retrouve la leptine, l'apeline, la résistine, le PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor 1) et l'adiponectine, mais également des cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-10 [113]. La capacité du tissu adipeux à produire des cytokines fait de l'adipocyte un élément important dans l'instauration d'un état inflammatoire chronique de bas niveau, observé chez les sujets en surpoids ou atteints d'obésité. La leptine serait particulièrement impliquée dans les dysfonctions cardiovasculaires associées à ces maladies en favorisant l'hypertrophie cardiaque, la dysfonction endothéliale et le remodelage cardiaque [114-117]. Les mécanismes qui conduisent à l'obésité peuvent en partie trouver leur origine dans une perturbation de certaines régulations du SNC, et en particulier au niveau de noyaux de l'hypothalamus, qui ne sont plus en mesure de freiner la prise alimentaire et d'ajuster la dépense énergétique face à un excès d'apports alimentaires et de stocks de masse grasse [118].

III/ Le tissu adipeux brun

Le TA brun (TAB) capte les acides gras (AG) circulants afin de générer de la chaleur sous forme d'ATP, en découplant la production d'énergie via la phosphorylation oxydative. Ce mécanisme contribue à la clairance des TG plasmatiques et limite le stockage des lipides [119]. A l'origine, on pensait que le TAB était retrouvé uniquement chez les animaux en hibernation, chez les petits mammifères et chez les nourrissons humains. De nombreux travaux suggèrent qu'il est également présent chez l'adulte et qu'il serait activé par le froid et par le système nerveux sympathique [120, 121]. Le TAB serait localisé chez l'Homme dans les régions cervicales, axillaires et paraspinales et représenterait 1 à 2% des réserves totales de graisse [122, 123]. De la même manière que le WAT, le TAB sécrète des adipokines, plus précisément des « batokines », telles que les facteurs de croissance des fibroblastes comme la neuréguline, mais également des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6. Étant donné le faible

pourcentage de TAB dans l'organisme, le rôle des batokines est encore peu connu, mais il a été démontré qu'elles exercent un rôle paracrine et autocrine [124].

IV/ Le tissu adipeux beige

Le tissu adipeux beige correspond à la présence d'adipocytes bruns au sein du tissu adipeux blanc. La graisse beige partage certaines caractéristiques du TAB, comme la clairance des TG plasmatiques mais elle est physiologiquement distincte du TAB du fait de différences dans l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme, l'inflammation et la transcription [125, 126]. La majorité des dépôts de WAT est sensible au brunissement dans des conditions particulières, telles que l'exposition au froid, l'exercice, la chirurgie bariatrique ou encore certains aliments. Chez le rongeur, le WAT sous-cutané est le dépôt le plus sensible au brunissement, alors que chez l'Homme c'est le WAT viscéral. Ce brunissement du WAT et son impact sur l'homéostasie énergétique posent la question des origines de sa formation. La première origine possible serait que les adipocytes beiges proviendraient d'une synthèse *de novo* à partir de cellules progénitrices lors d'une stimulation, par exemple par le froid, et pourraient par la suite rester « dormants » jusqu'à ce qu'ils soient de nouveau stimulés. Ce phénomène du passage de l'adipocyte blanc à beige, dormant à actif, est nommé « transdifférenciation ». La deuxième origine possible serait que les adipocytes beiges auraient leur propres cellules précurseurs, différentes de celles des adipocytes blancs. Des études complémentaires sont nécessaires pour élucider l'origine des adipocytes beiges [126-128].

V/ Les tissus adipeux cardiaques

De récentes études translationnelles ont montré l'importance d'une communication étroite entre le TA et le tissu cardiaque et vasculaire [129]. Les dépôts de graisse ectopique, c'est-à-dire entourant les organes, vont influencer par voie paracrine leur fonctionnement. Le tissu adipeux cardiaque est composé de deux tissus d'origines embryologiques et de localisations différentes.

1/ Le tissu adipeux épïcardique (TAE)

Le TAE est situé entre la surface externe du myocarde (épïcarde) et le feuillet viscéral du péricarde (figure 5). Chez l'Homme, il est considéré comme le dépôt graisseux viscéral du cœur. Il partage avec le myocarde la même microcirculation par les artères coronaires ainsi qu'une origine embryologique similaire. De plus, le TAE servirait de réserve énergétique locale au cœur et aurait également une fonction thermogénique en protégeant le cœur de l'hypothermie [130]. Le TAE est donc en relation étroite avec le myocarde, sur lequel il est susceptible d'exercer un rôle important par une action paracrine ou par sécrétion de différents composés actifs dans la circulation coronarienne. Dans des conditions physiologiques, le TAE exercerait des effets protecteurs en stimulant le métabolisme des acides gras libres et en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) et anti-fibrotiques comme l'adiponectine. Cette dernière participerait à la réduction de la production d'anion superoxyde à partir de la NADPH-oxydase [131] et améliorerait la biodisponibilité du monoxyde d'azote et la fonction endothéliale coronaire [132, 133]. Cependant, dans certaines conditions pathologiques, le TAE acquiert un profil pro-athérogène par la libération d'adipocytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α) et favoriserait le stress oxydatif provoquant des lésions endothéliales [134]. Chez l'Homme, la mise en coculture de tissus atriaux de patients souffrant d'insuffisance coronarienne avec du TAE humain, a mis en lumière le développement d'une fibrose myocardique, non induite par la coculture avec du tissu adipeux sous cutané. Ce modèle original d'organo-culture révèle le caractère pro-fibrotique du TAE dont l'activine A serait le principal médiateur en favorisant l'accumulation de collagène 1, 3 et 6 au niveau des faces endocardiques et épïcardiques, mais également intra-myocytaires [135-137]. La présence d'anticorps anti-activine A neutraliserait les effets pro-fibrotiques du sécrétome du TAE [137]. L'activine A appartient à la super famille des Transforming Growth Factor- β (TGF- β) et est une cytokine multifonctionnelle impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires, tels que la différenciation cellulaire, l'inflammation ou encore l'apoptose. D'autre part, la mise en culture de cellules cardiomyocytaires avec du TAE issus de patients DT2 a montré que la libération de l'activine A par le TAE de patients DT2 était accrue et qu'elle contribuerait au dysfonctionnement contractile des cardiomyocytes en réduisant l'expression de SERCA2a (sarcoplasmique/endoplasmique Ca²⁺ ATPase) au niveau du réticulum sarcoplasmique. Par ailleurs, l'activine A sécrétée par le TAE induirait l'expression

de miR-143 dans les cardiomyocytes humains et affecterait négativement la voie Akt et l'absorption du glucose médiée par l'insuline, pouvant participer à la mise en place de la résistance à l'insuline cardiaque des sujets diabétiques [137, 138]. L'activine A sécrétée par le TAE serait donc impliquée dans le développement d'une fibrose myocardique chez des patients présentant déjà une pathologie cardiaque et serait en partie responsable de la mise en place de la cardiomyopathie diabétique. Il est également intéressant de noter que le diabète sucré est associé à une infiltration monocytaire CD14⁺ accrue dans le TAE, favorisée par la petite taille de ces adipocytes et confirmant l'implication de ce TA dans la cardiomyopathie diabétique [139].

Parallèlement, les taux plasmatiques d'activine A sont plus élevés chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque et les patients présentant un infarctus du myocarde aigu associé à un trouble de la régulation glycémique. Chez la souris, la surexpression de l'activine A aggraverait les lésions cardiaques induites par une ischémie reperfusion en favorisant l'apoptose [140]. Des études supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour préciser la fonction de l'activine A dans la pathogénèse des altérations cardiaques.

Chez l'Homme, le TAE couvre 80% de la surface du cœur alors qu'il est absent chez la souris [141], c'est pourquoi nos expérimentations chez la souris porteront uniquement sur le tissu adipeux péricardique.

2/ Le tissu adipeux péricardique (TAP) :

Le TAP est situé à l'extérieur du péricarde pariétal (Figure 5) et son apport sanguin est assuré par des artères non coronaires. Son volume est corrélée positivement avec l'obésité liée au syndrome métabolique et aux anomalies cardiaques [142]. Le TAP a une fonction métabolique via la sécrétion de différentes cytokines, comme l'activine A, qui vont agir directement au niveau du cœur en favorisant notamment la fibrose.[143, 144]. Le rôle du TAP dans la pathogénèse des altérations cardiaques est encore peu étudié chez la souris, mais il pourrait exercer des effets similaires à ceux du TAE chez l'Homme.

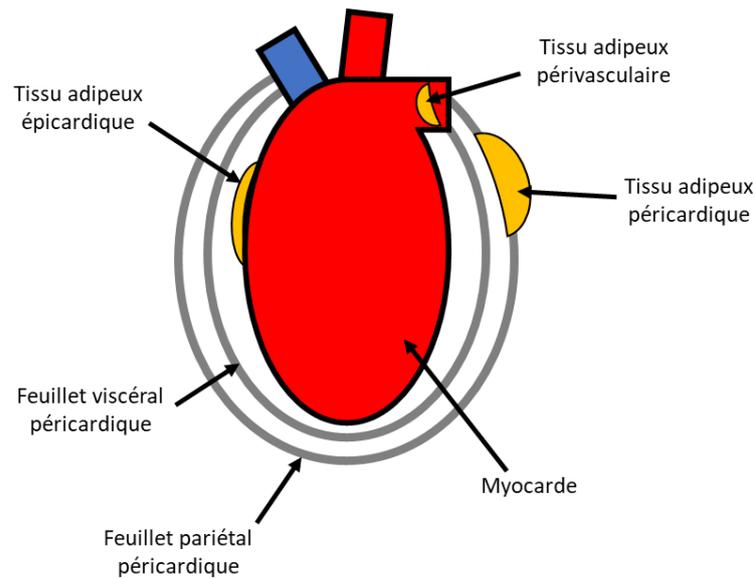


Figure 5 : Schéma de la localisation des tissus adipeux épigardique, péricardique et péricardique chez l'Homme.

C/ La programmation périnatale du risque cardio-métabolique

I/ Origines développementales de la santé

La période foetale et postnatale immédiate est déterminante dans l'orientation ultérieure de la santé cardiovasculaire et métabolique d'un individu. En effet, en plus des différents éléments hérités du génome parental qui peuvent, ou non, prédisposer à des pathologies cardio-métaboliques, pendant la grossesse, l'environnement nutritionnel et hormonal joue lui aussi un rôle essentiel pour modeler de manière pérenne l'expression des gènes du fœtus ou du nouveau-né. Dans ce cadre, depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études scientifiques se sont intéressées à l'impact de l'environnement nutritionnel pendant les périodes de croissance et de développement critiques que sont les périodes foetales et postnatales, sur le développement des maladies à l'âge adulte. Les premiers travaux épidémiologiques, conduits par l'équipe de David Barker, ont établi un lien très clair entre une situation de sous-nutrition pendant la période foetale, souvent liée à une nutrition insuffisante de la mère pendant la grossesse, et la survenue d'un surpoids, d'une insulino-résistance et d'une augmentation de la prévalence de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte [145-149]. Ces travaux, corroborés par ceux de nombreuses autres équipes, ont été par la suite étendus à d'autres types de perturbations nutritionnelles pendant la grossesse

qui se rencontrent lors du diabète gestationnel ou de l'obésité maternelle [150]. En effet, relié à sa mère par le cordon ombilical et dépendant uniquement des échanges fœto-placentaires pour son alimentation, le fœtus est particulièrement sensible aux perturbations nutritionnelles [151]. Ainsi, l'exposition du fœtus à une sous- ou suralimentation mais aussi à des perturbateurs endocriniens, ou à certains composants toxiques sont des déterminants clés du développement ultérieur de pathologies [152]. Dans les années 2000, le concept des « origines développementales de la santé », le DOHaD pour Developmental Origins of Health and Diseases, a émergé [153, 154], introduisant l'idée d'une potentielle origine fœtale des maladies de l'adulte. Ce concept établit une relation entre l'environnement utérin (incluant les périodes embryonnaire et fœtale) et une susceptibilité accrue aux maladies chroniques à l'âge adulte et introduit l'idée d'une « programmation » d'un individu à un certain phénotype à l'âge adulte [155].

Si un grand nombre de travaux épidémiologiques, cliniques et expérimentaux ont porté sur l'influence de l'environnement prénatal, fortement lié au statut nutritionnel de la mère lors de la grossesse, sur la survenue de pathologies de l'adulte, il semble que la naissance ne constitue pas un point de non-retour de ces phénomènes de programmation. Ainsi, l'environnement nutritionnel pendant la période postnatale peut aussi avoir un impact majeur sur la santé des individus. En effet, il a été montré que des nouveaux nés présentant une prise de poids importante après la naissance étaient plus susceptibles de présenter un surpoids, une élévation de la PA, ainsi qu'un syndrome métabolique [156, 157]. Le concept du DOHaD a donc été étendu de la conception de l'enfant à ses deux ans, soit les « 1 000 premiers jours ». Toutefois, les études cliniques sur la programmation postnatale sont à ce jour peu nombreuses, et ne permettent pas d'en explorer l'impact précis sur le cœur, ni d'en approcher les mécanismes. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux, notamment chez le rongeur, a permis de contourner cette difficulté et d'apporter des informations essentielles sur l'influence de l'environnement nutritionnel postnatal sur le système cardiovasculaire.

II/ Modèle expérimental de la suralimentation postnatale (SAPN)

1/ Généralités

Chez la souris, le nombre moyen de souriceaux par portée est situé entre 8 et 12. G.C. Kennedy a été le premier à induire, chez les rongeurs, une SAPN en réduisant la taille des portées après la naissance [158]. Ce modèle de SAPN consiste à réduire la taille des portées au nombre de 3 ou 4 petits par mère, plaçant ainsi les animaux en conditions de SAPN, alors que le groupe témoin, Normo Alimenté (NA) est constitué de 9 à 12 petits par mère (figure 6A). La réduction du nombre de souriceaux par mère facilite l'accès à l'alimentation maternelle pour les nouveaux nés et entraîne une augmentation des apports nutritionnels pour chaque petit, engendrant rapidement une hausse du PC des animaux SAPN (figure 6B).

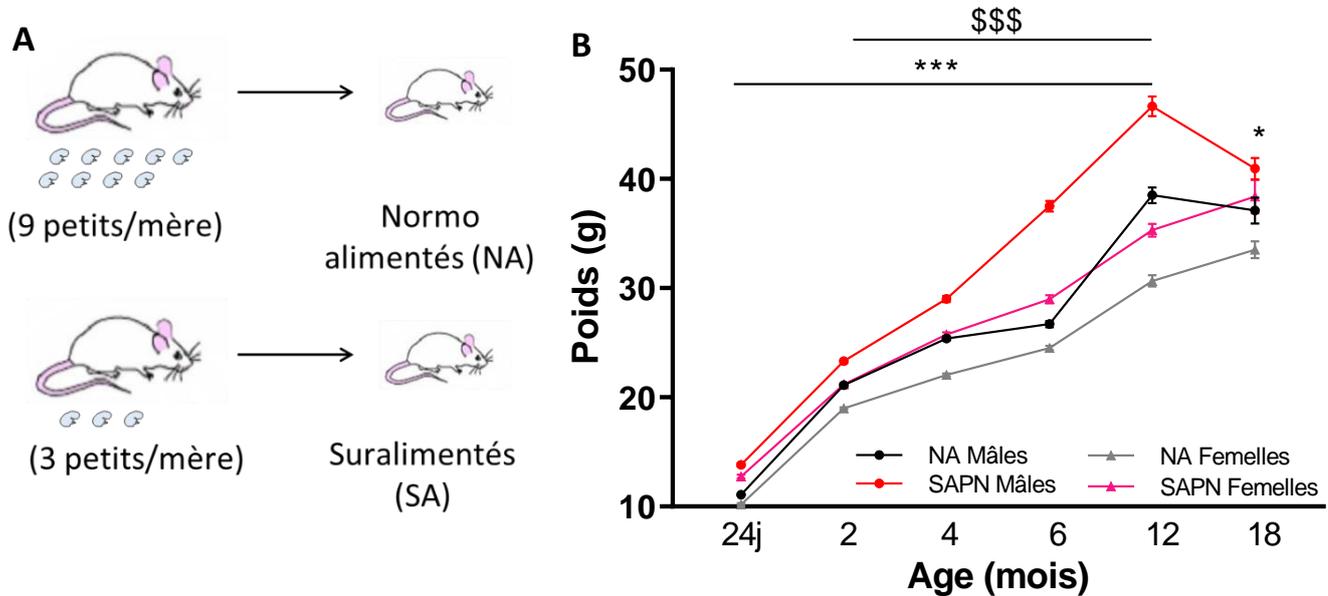


Figure 6 : Modèle de SAPN par réduction de la taille des portées (A) et suivi du poids corporel des animaux (B). Significativement différent du groupe NA du même sexe et âge : * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$. Significativement différent au sein d'un groupe du même âge mais de sexe opposé : \$\$\$: $p < 0,001$.

Ce modèle imite de façon pertinente la suralimentation précoce observée chez l'Homme et représente un outil efficace pour étudier les mécanismes adaptatifs impliqués dans cette programmation.

2/ Conséquences cardio-métaboliques d'une SAPN

De nombreuses équipes de recherche ont utilisé des modèles de rongeurs pour étudier l'impact de la SAPN au niveau de différents organes (figure 7), mais nous n'évoquerons ici uniquement les conséquences cardiovasculaires et métaboliques.

(a) Conséquences cardiovasculaires d'une SAPN

Chez l'Homme, dans les années 1990, Barker a été le premier à mettre en évidence le lien entre l'alimentation *in utero* et l'apparition de maladies cardio-métaboliques à l'âge adulte. Les différents travaux de Barker ont montré qu'un environnement de croissance défavorable pendant la vie fœtale conduisait à un faible poids de naissance, et augmentait le risque d'HTA [159] et de mortalité après une cardiopathie ischémique [148]. Expérimentalement, chez des rongeurs mâles adultes ayant subi une SAPN, il a été montré via une mesure *in vivo* de PA une augmentation modérée mais significative des pressions artérielles systoliques et diastoliques, reliées à une altération de la fonction endothéliale [160-163]. En effet, la réponse vasodilatatrice endothéliale stimulée par l'insuline est diminuée d'une part par la réduction de l'activation de la eNOS conduisant à une diminution de la production de monoxyde d'azote (NO), puissant vasodilatateur, et d'autre part par l'activation accrue de la voie des MAP kinases (Mitogen-activated protein kinases). La stimulation de la voie des MAPK par l'insuline favorise l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire, telles que la sélectine E ou VCAM-1, et stimule la libération du peptide vasoconstricteur endothéline-1, conduisant au développement d'une hypertension artérielle à long terme [164]. De plus, chez des rats SAPN adultes, il a été mis en évidence des modifications morphologiques au niveau vasculaire qui favorisent l'augmentation de la PA, incluant des teneurs en collagène élevés et une diminution de la densité de fibres élastiques, associées à un épaississement de la paroi aortique [165, 166].

Des expérimentations conduites dans notre laboratoire ont montré que l'impact cardiovasculaire d'une SAPN de 21 jours chez le rat ou la souris est très précoce : dès le 24^{ème} jour de vie, l'expression de nombreux gènes cardiaques impliqués notamment dans l'organisation structurelle cardiaque (collagène, actine, myosine, dystrophine...) et dans les

mécanismes de vasoréactivité (endothéline-1 et son récepteur) est accrue ou diminuée comparée à des animaux NA [167]. Ainsi, ces changements précoces vont prédisposer le cœur à des troubles fonctionnels plus tardifs. En effet, nous avons démontré qu'à l'âge adulte les souris ayant subi une SAPN présentaient une diminution de la fonction contractile et une dilatation ventriculaire gauche et une plus grande sensibilité cardiaque aux lésions d'ischémie reperfusion induites *ex vivo* [167, 168]. Une autre étude menée chez le rat âgé de 120 jours a montré une hypertrophie ventriculaire gauche mais sans dysfonction contractile ni de dilatation ventriculaire gauche [162]. De plus, il a été montré une augmentation de la fibrose cardiaque, associée à une plus grande quantité de collagène cardiaque [169, 170] et à une expression et une activité accrue des métalloprotéinases de type 2 (MMP-2) chez ces animaux SAPN [171]. Ce mécanisme de remodelage peut être stimulé par les taux de leptine et par le stress oxydant, qui sont également augmentés chez les souris adultes SAPN par rapport aux souris NA [171].

(b) Conséquences métaboliques d'une SAPN

Barker *et al.* ont montré qu'une sous nutrition pendant la grossesse entraînait une reprogrammation du métabolisme fœtal avec une mise en place d'une insulino-résistance et un retard de croissance [145]. De la même façon qu'une sous nutrition, le diabète gestationnel a une incidence à long terme sur la santé de l'enfant avec un risque d'augmentation de la masse adipeuse et d'intolérance au glucose [150]. Le diabète gestationnel reste aujourd'hui la première cause de macrosomie fœtale (poids de naissance supérieur à 4 kg). En 1976, Dorner *et al.* ont montré qu'une SAPN durant le premier trimestre de la vie, prédisposait au développement d'une obésité à l'âge adulte [172]. Ces deux types de modifications de l'environnement, sous ou suralimentation, augmentent de près de 4 fois la probabilité de développer un surpoids ou une obésité ultérieurement dans la vie (entre 2 et 46,5 ans) [173]. Enfin, l'allaitement maternel serait un facteur protecteur de l'obésité chez l'enfant [174, 175] et à l'âge adulte [176] en réduisant le risque de surnutrition par rapport au lait maternisé. Une étude épidémiologique sur 9 357 enfants en Bavière a montré une relation inverse entre la durée de l'allaitement maternel et le risque pour les enfants d'être en surpoids à l'âge adulte [177]. La composition des laits maternisés enrichis en graisse, protéines et minéraux favoriserait l'installation d'une obésité ultérieurement [178].

Chez le rongeur, certaines études indiquent que la consommation de lait dans les portées de taille réduite est significativement augmentée [179, 180] et que le lait est plus riche en lipides, en particulier en triglycérides [181]. Cette augmentation de consommation de lait s'accompagne rapidement d'un surpoids, observé dès le sevrage, et parfois d'une obésité pour les animaux mâles et femelles (figure 7). Toutefois, les niveaux d'augmentation du PC peuvent varier selon les souches, le sexe, l'origine géographique et la taille des portées, de 10% à 56% chez les rats Wistar et Sprague-Dawley, et de près de 15 à 30% chez la souris (C57BL/6 ou Suisse). Ce gain de poids se maintient tout au long de la vie dans une certaine proportion [171], et ce, alors que les animaux soumis à une SAPN reçoivent une alimentation identique à celle des témoins. La prise de poids est également favorisée par des modifications précoces des circuits hypothalamiques régulant l'appétit et la satiété, menant à court terme à une hyperphagie et donc au développement d'un surpoids puis d'une obésité [182-184]. Ces modifications hypothalamiques impliquent une augmentation du nombre de neurones à galanine (stimulateur de la prise alimentaire) [185] ainsi que d'autres neuropeptides responsables du phénotype de surpoids et d'obésité chez les rongeurs, tels que le neuropeptide Y (NPY) et l'AGRT (Agouti related transcript) [186]. La leptine, qui est une hormone anorexigène, sécrétée par le TA, mais aussi à moindre degré par les cardiomyocytes, agit au niveau hypothalamique via son récepteur Ob-Rb qui va inhiber la réponse induite par les neuropeptides orexigènes comme le NPY et l'AGRT [187]. Bien qu'une hyperleptinémie soit observée chez les animaux suralimentés, il semblerait qu'une résistance à la leptine se mette en place au niveau central, régie par la réduction de l'expression du récepteur Ob-Rb hypothalamique chez ces mêmes animaux, favorisant ainsi l'hyperphagie [156, 179, 186, 188-191].

Conjointement à la hausse du PC, l'adiposité des souris adultes SAPN augmente de 47% [171], avec un nombre et une surface adipocytaires accrus [156, 192]. Des études *in vitro* sur des adipocytes isolés de tissu adipeux blanc de rat ayant été soumis à une SAPN, ont montré une réduction de l'entrée du glucose stimulée par l'insuline, associée à une diminution de l'expression des transporteurs au glucose GLUT4 et GLUT1 [193]. De surcroît, la SAPN induit une diminution du substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS-1), du PI3K et de l'activité de la PKB/Akt (protéine kinase B qui phosphoryle les résidus sérine) suggérant que la SAPN altère la voie de signalisation de l'insuline et favorise l'installation progressive d'une résistance à

l'insuline [194]. En outre, le développement excessif du volume de TA entraîne une libération accrue de cytokines pro inflammatoires, retrouvées dans le TA de rats [192] et de souris adultes SAPN [195]. On retrouve chez les animaux SAPN une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'interleukine (IL-6), du facteur de nécrose tumorale- α (TNF α), du récepteur 1 du TNF (TNFR-1), de la résistine et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1), révélateurs d'un état pro-inflammatoire au sein du WAT.

Par conséquent, les rongeurs qui ont subi une SAPN présentent une croissance rapide accompagnée de désordres métaboliques importants notamment au niveau du TA et du cœur, altérant l'homéostasie cardiovasculaire et métabolique à l'âge adulte : obésité, résistance à l'insuline, intolérance au glucose, stéatose hépatique et rénale.

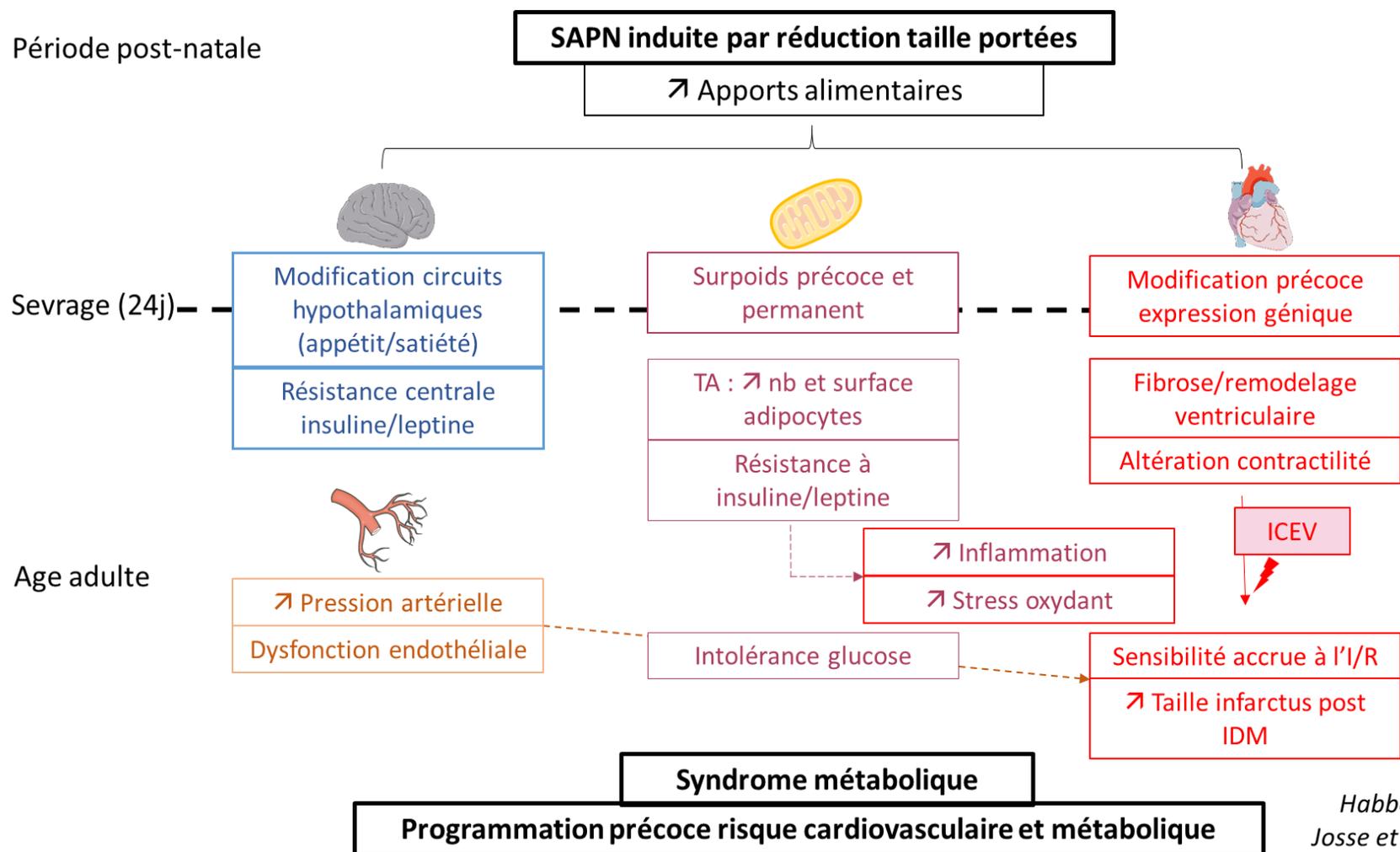


Figure 7 : Conséquences cardiovasculaires et métaboliques d'une SAPN chez le rongeur. TA : Tissu adipeux ; ICEV : ischémie cardiaque *ex vivo* ; I/R : ischémie reperfusion ; IDM : infarctus du myocarde

Les modulations phénotypiques « programmées » pendant les périodes fœtales et postnatales par des facteurs environnementaux, hormonaux et/ou nutritionnels, procèdent de mécanismes dits épigénétiques qui, sans changer la séquence du génome de l'individu, vont modifier l'expression de son patrimoine génétique [196].

3/ Les mécanismes épigénétiques

L'épigénétique est l'ensemble des processus moléculaires permettant de moduler l'expression des gènes sans pour autant modifier la séquence de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) [197]. Ces modifications sont induites par l'environnement au sens large : au cours du développement, la cellule reçoit et intègre en permanence des signaux afin de se spécialiser ou d'ajuster son activité à la situation. Les marques épigénétiques permettent une modulation de l'expression des gènes selon le stade de développement, selon l'organe et le type cellulaire et enfin selon l'environnement. Ce phénomène peut être transitoire, mais il peut également persister dans le temps, même lorsque le signal qui l'a induit disparaît. Il existe plusieurs modifications épigénétiques représentant la majorité des remaniements (figure 8):

- La méthylation de l'ADN : c'est le mécanisme épigénétique majoritaire. Des groupements méthyles sont additionnés par l'action d'ADN méthyltransférases sur le carbone 5 des cytosines, principalement dans le contexte de dinucléotides CpG, c'est-à-dire d'une séquence nucléotidique CG. La présence de cytosines méthylées est généralement associée à une répression transcriptionnelle car elle inhibe directement la fixation de certains facteurs de transcription [198].
- Les modifications des histones : L'ADN est enroulé autour de petites protéines appelées « histones », dont l'ensemble forme le nucléosome. Des chapelets de nucléosomes créent la chromatine, qui peut adopter deux niveaux de condensation : l'euchromatine correspond à une chromatine peu condensée facilitant l'expression des gènes ; et l'hétérochromatine, structure plus dense empêchant l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription [199]. Quatre types majeurs de modifications au niveau de la queue des histones conditionnent la capacité de ces enroulements et peuvent modifier l'accessibilité de certains gènes, qui pourront être traduits ou non en protéines : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation [200].

Ces modifications seraient impliquées dans les MCV, notamment les histones acétylases et désacétylases, qui participeraient au contrôle de l'hypertrophie cardiaque [201, 202] et à la mise en place de l'insuffisance cardiaque [203].

- Les ARN non codants : Certains ARN non codants, tels que les ARN interférents (ARNi), peuvent réguler l'expression génique en interférant avec la transcription ou la traduction des gènes. Les ARNi sont produits par l'ARN polymérase II à partir d'une double chaîne d'ARN ou d'ADN exogène (introduit dans la cellule). L'ARN double brin subit ensuite un clivage enzymatique par l'enzyme appelée Dicer afin de produire les ARNi matures d'une longueur de 20 à 25 nucléotides. Une fois clivés, ces petits ARNi exercent une correspondance complète avec l'ARNm cible de la cellule pour entraîner sa dégradation et empêcher sa traduction en protéine [204].

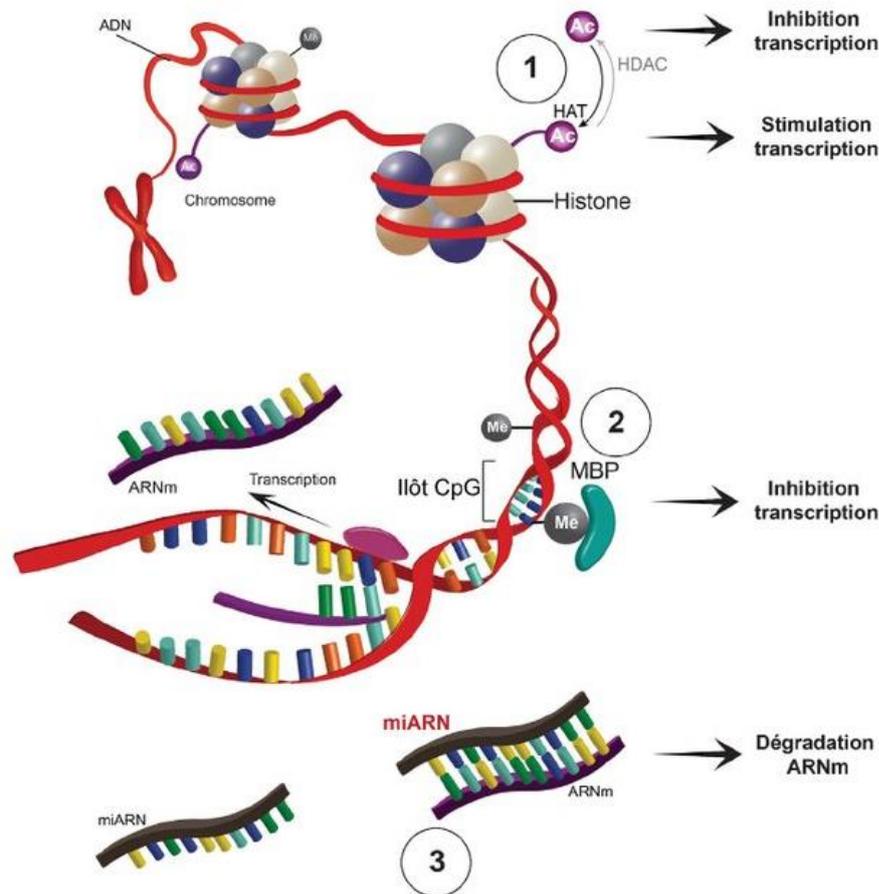


Figure 8 : Mécanismes épigénétiques [205]. Ac : acétylation ; Me : méthylation ; HDAC ; histone désacétylase ; HAT : histone acétylase ; MBP : methylCpG binding protein ; ARNm : ARN messenger

Toutes ces marques ont la propriété d'être stables et de se transmettre au cours des divisions cellulaires chez un individu [206]. Néanmoins, elles sont fortement influencées par l'environnement hormonal et nutritionnel tout au long de la vie. Ainsi, un régime riche en graisses influence fortement les modifications épigénétiques pour induire un stress métabolique en faveur d'une prédisposition à l'obésité, d'une résistance à l'insuline, d'un diabète et des MCV [207].

Ces changements épigénétiques, s'ils s'avèrent parfois essentiels pour adapter le fœtus à l'environnement intra-utérin et postnatal, prédisposent dans certains cas l'organisme à développer des dysfonctionnements ou des maladies lorsque les modifications obtenues ne sont pas cohérentes avec l'environnement de l'individu [208, 209]. Les conséquences d'une ischémie cardiaque pourraient notamment être aggravées par une hyperméthylation de l'ADN qui favoriserait la formation de fibrose en stimulant la production de collagène par les myofibroblastes cardiaques, conduisant à l'augmentation de la taille de l'infarctus myocardique [210].

III/ Ischémie reperfusion cardiaque

1/ Généralités sur l'ischémie reperfusion cardiaque

L'ischémie myocardique correspond à un déséquilibre entre les apports en oxygène et en nutriments du tissu myocardique, et ses besoins pour son fonctionnement. L'ischémie résulte de la réduction ou de l'interruption du débit sanguin dans un territoire vasculaire donné. Selon l'OMS, l'ischémie cardiaque est la cause majeure de mortalité liée aux maladies cardiovasculaires [211] représentant environ 16% des décès totaux en 2018. L'ischémie cardiaque peut être induite soit par la formation d'un thrombus occlusif, soit par une sténose, c'est-à-dire le rétrécissement du diamètre d'une artère coronaire. La zone qui est normalement irriguée par une artère sténosée ou obstruée est nommée « aire à risque » (AAR), et en fonction de la durée et de l'intensité de l'ischémie, les atteintes tissulaires peuvent y être réversibles ou irréversibles. La réversibilité s'observe plus particulièrement lors d'une ischémie de courte durée suivie d'une reperfusion qui réenclenche l'activité métabolique des cardiomyocytes. En revanche, lorsque l'ischémie est prolongée, les

dommages tissulaires deviennent irréversibles et conduisent à la mort cellulaire par nécrose. A l'échelle tissulaire, ces lésions sont caractérisées par des inclusions intramitochondriales et par des ruptures membranaires pouvant conduire à la fuite de composants cellulaires et à une anarchie architecturale [212]. Chez l'Homme, l'infarctus apparaît lorsque la durée de l'ischémie dépasse la durée « seuil » de 30 min (figure 9). Pour limiter les dégâts ischémiques (zone bleue figure 9), le tissu cardiaque doit être reperfusé le plus rapidement possible. La reperfusion restaure le flux sanguin et atténue les lésions ischémiques [213], mais elle s'accompagne de nouvelles lésions cellulaires, appelées « lésions de reperfusion », altérant à leur tour la fonction cardiaque (zone rouge, figure 9) [214-216]. Les lésions de reperfusion sont moindres par rapport aux lésions ischémiques mais elles peuvent tout de même représenter jusqu'à 50% de la taille finale de l'infarctus (zone B, figure 9).

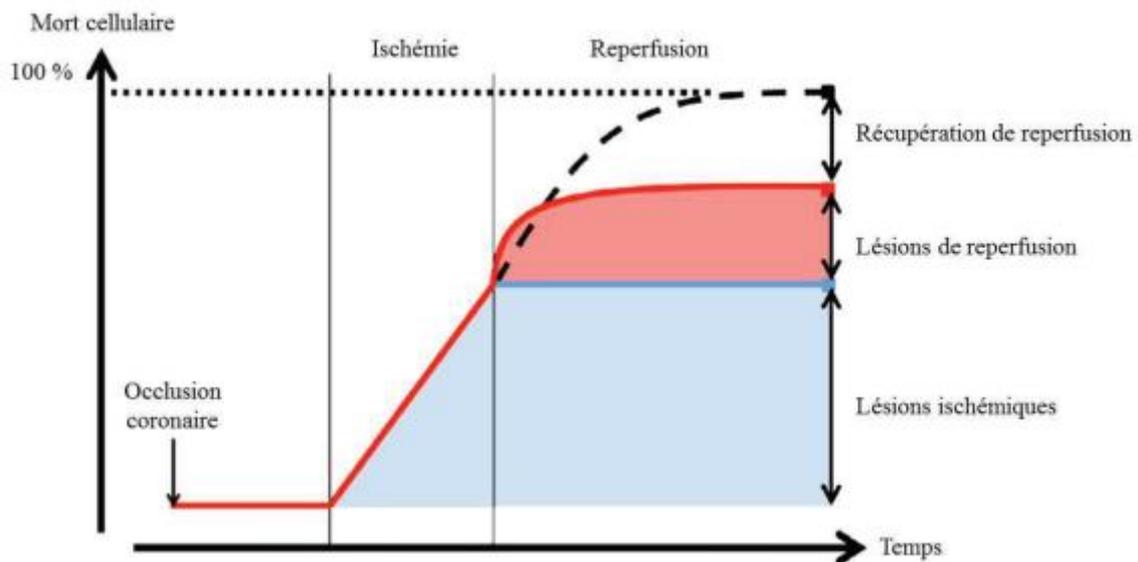


Figure 9 : Cinétique d'extension temporelle de l'infarctus du myocarde [217].

En pratique clinique, lorsqu'un patient est hospitalisé pour un infarctus du myocarde, la reperfusion peut être mise en place par fibrinolyse médicamenteuse ou angioplastie interventionnelle [218] idéalement dans les douze heures suivant l'infarctus afin d'optimiser les chances de survie cellulaire [219].

2/ Conséquences moléculaires et cellulaires de l'ischémie cardiaque

En conditions physiologiques, la synthèse d'Adénosine Tri Phosphate (ATP) nécessaire à l'activité contractile du myocarde est assurée par le métabolisme oxydatif faisant intervenir le cycle de Krebs (condition aérobie). En situation d'ischémie, où l'oxygène fait défaut (figure 10, (1)), un switch métabolique va s'opérer au sein du cœur afin de maintenir une production d'ATP suffisante à la contraction cardiaque. Ainsi, la production d'ATP va être assurée par la glycolyse anaérobie, faisant intervenir la conversion du glucose en pyruvate puis en lactate (2). La faible rentabilité de cette voie métabolique est responsable d'une part d'une déplétion myocardique en ATP (3), et d'autre part d'une surcharge intracellulaire en protons à l'origine d'une acidose intracellulaire (3) [220]. L'acidose active l'échangeur Na^+/H^+ (4) afin de rétablir le pH intracellulaire, permettant la sortie des protons contre un flux entrant de Na^+ . Par ailleurs, lorsque l'ischémie perdure, la déplétion prolongée en ATP (3) diminue l'activité des pompes Na^+/K^+ ATPase (5), favorisant l'accumulation intracellulaire de sodium, réduisant le gradient intramembranaire sodique. La réduction de ce gradient engendre l'activation en sens inverse de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (6) pour faire sortir le sodium de la cellule, mais est responsable d'une surcharge calcique intracellulaire [67] (7). L'altération de l'homéostasie ionique cellulaire entraîne une perte de la polarité membranaire, favorisant l'entrée d'eau dans la cellule (8) et engendrant le gonflement cellulaire et la désorganisation du cytosquelette. L'ensemble de ces mécanismes aboutissent à des lésions cellulaires nécrotiques (9) dont la gravité dépend de la survenue de la reperfusion.

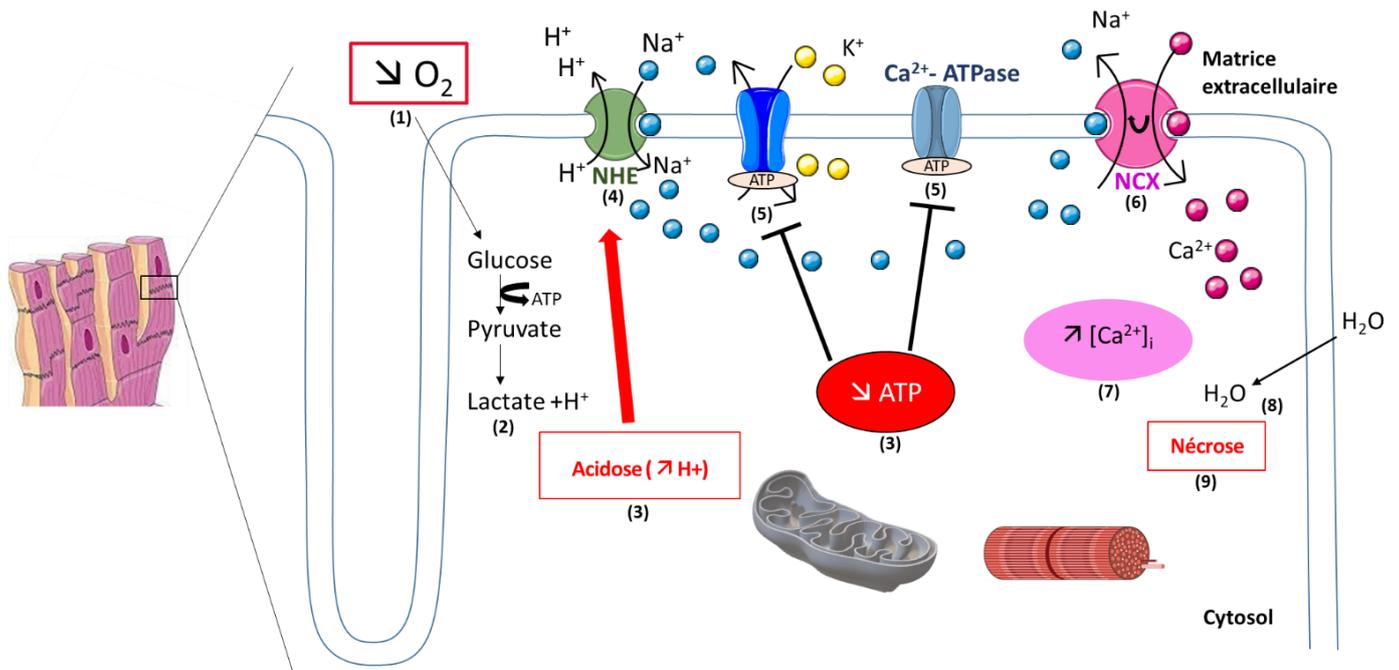


Figure 10 : Modifications de l'homéostasie calcique au sein des cardiomyocytes induites par l'ischémie. NHE : échangeur Na^+ / H^+ ; Ca^{2+} -ATPase : pompe calcique dépendante de l'ATP ; NCX : échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ [157]

3/ Conséquences moléculaires et cellulaires de la reperfusion cardiaque

La reperfusion s'accompagne d'effets délétères qui lui sont propres et d'une accélération du processus de mort cellulaire initié par l'ischémie [221, 222]. La reperfusion réintroduit brutalement de l'oxygène (figure 11, (1)) dans la cellule hypoxique, permettant la remise en activité des canaux ATP dépendant (NHE et NCX) (2) (3), afin de réguler le besoin de Ca^{2+} pour la contraction des cardiomyocytes. Cependant, la réoxygénation brutale et rapide induite par le retour du flux sanguin surcharge la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) fonctionnellement endommagée par l'ischémie, et va favoriser la production de molécules pro-oxydantes (4), comme l'anion superoxyde, engendrant un stress oxydant intracellulaire sévère (4). Le concept du « paradoxe de l'oxygène » décrit cette confrontation entre la nécessité d'apports en O_2 pour la survie cellulaire et la production délétère de ROS responsable de graves lésions cellulaires dès les premières minutes de reperfusion : dommages à l'ADN, oxydation protéique, peroxydation lipidique et activation indirecte de l'inflammation via le recrutement de neutrophiles [223, 224]. La production excessive de ROS induit également l'oxydation de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA) (5)

qui est responsable de l'aggravation de la surcharge calcique intracellulaire (6). Ce calcium en excès favorise l'hyper-phosphorylation des récepteurs à la ryanodine (RyR-2) (7) facilitant les fuites calciques au niveau du réticulum sarcoplasmique (8) contribuant à augmenter davantage la concentration de Ca^{2+} intracellulaire [67] (6). Enfin, cette dernière favorise une surcharge calcique au sein de la mitochondrie (9), déjà en proie au stress oxydant (4) [225, 226]. L'ensemble de ces mécanismes tend vers l'ouverture du pore de perméabilité mitochondriale (mPTP) (10), canal ou ensemble complexe de différents canaux à ce jour non clairement identifiés, situé sur la membrane mitochondriale interne. En condition physiologique, son activation par le Ca^{2+} permet la diffusion passive de molécules de taille inférieure à 1,5 kDa [227] mais au cours d'une ischémie-reperfusion, la surcharge calcique et le stress oxydant mitochondrial initient son ouverture et entraîne une perte de la perméabilité sélective de la membrane mitochondriale conduisant à l'effondrement du potentiel membranaire et au gonflement mitochondrial. Il en résulte i) une déplétion de la synthèse de l'ATP aggravant les troubles cellulaires initiés par l'ischémie et menant la cellule à la nécrose [228], ii) la libération de facteurs pro-apoptotiques, dont le cytochrome c et de l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) dans le cytosol [229] (11) qui participent à l'activation des caspases, notamment la caspase 3, chargées d'enclencher le processus de mort cellulaire programmée, l'apoptose [230, 231] (figure 11, (12)).

Ainsi, la surcharge calcique des cardiomyocytes et la surproduction de ROS sont les deux mécanismes principaux interdépendants responsables des lésions d'IR myocardiques.

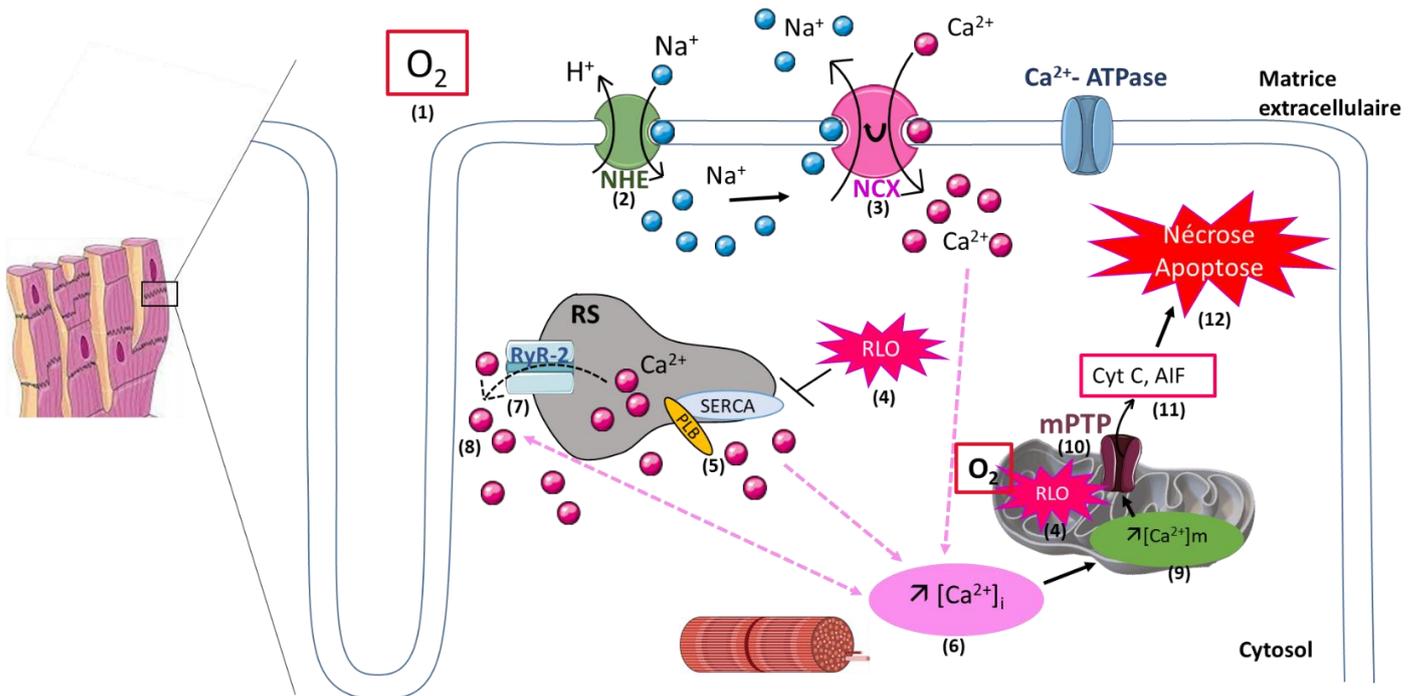


Figure 11 : Modifications cellulaires induites par la reperfusion myocardique. RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PLB : phospholamban ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} - ATPase

La reperfusion est également à l'origine d'arythmies ventriculaires qui apparaissent de façon précoce dès les premières secondes de la reperfusion. Leur sévérité dépend de la durée de l'ischémie, allant de simples extrasystoles à l'initiation de fibrillations ventriculaires irréversibles [232, 233]. Par ailleurs, malgré le rétablissement de la circulation sanguine, la reperfusion induit une sidération myocardique, encore appelée « myocardial stunning », qui correspond à une dysfonction contractile ventriculaire persistante en l'absence de lésions irréversibles. Cette altération de la fonction contractile est initiée par la surcharge calcique et la production excessive de ROS mais elle est réversible [234]. La disparition de ces altérations contractiles ventriculaires post-ischémiques dépend de la sévérité de l'ischémie et peut nécessiter un délai allant de quelques heures à plusieurs jours.

Enfin, malgré les avancées techniques pour améliorer la reperfusion coronaire des patients qui ont subi un infarctus du myocarde, le phénomène de « no reflow » persiste dans 20 à 50% des cas [235]. Le « no reflow » se définit par l'absence de reperfusion du tissu cardiaque post ischémique en dépit de la désobstruction de l'artère coronaire coupable de l'ischémie. Un œdème cellulaire peut en être la cause par compression des micro-vaisseaux

mais le traitement de l'ischémie par thrombolyse peut également engendrer l'afflux de débris plaquettaires et/ou thrombotiques [236]. En outre, l'altération de la fonction endothéliale des vaisseaux coronaires en lien avec le stress oxydant est responsable de la diminution de la libération du NO, principal agent vasodilatateur et puissant antiagrégant plaquettaire [237]. La diminution de la biodisponibilité du NO va permettre l'adhésion facilitée des neutrophiles à la paroi vasculaire, et ainsi contribuer à l'aggravation du phénomène de « no reflow ».

L'ensemble de ces mécanismes convergent vers la mort cellulaire et participent à une dysfonction cardiaque. Cependant, le développement des connaissances sur la physiopathologie de l'IR cardiaque a permis de développer des méthodes cliniques de protection du cœur face aux lésions induites lors de ces événements pathologiques. Il est possible de réduire la taille de l'infarctus cardiaque par des méthodes de cardioprotection en conditionnant le cœur aux lésions d'IR. Mais le caractère imprévisible de l'IDM ne permet pas d'agir pendant la phase ischémique chez l'Homme, même si le pré-conditionnement chez le chien, induit par 4 cycles de 5 mins d'ischémie suivie de 5 mins de reperfusion en amont d'une ischémie permet de réduire significativement la taille de l'infarctus [238]. En revanche, il est possible d'agir lors de la reperfusion. Ainsi, une des premières études cliniques sur la cardioprotection en 2005 a montré que le post-conditionnement ischémique réalisé par le gonflement et le dégonflement du ballon d'angioplastie pendant des séquences d'une minute permettait de réduire la taille de l'infarctus de 36% [239].

Ces phénomènes de pré et post conditionnements ischémiques ont fait l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques afin de réduire la taille de l'infarctus du myocarde. Ces deux types de conditionnement cardiaques activent des voies de signalisation communes [240].

4/ Voies de cardioprotection

Le pré et le post-conditionnement vont activer des voies de signalisation cellulaires par l'intermédiaire de nombreux facteurs comme la bradykinine, l'adénosine, des cytokines (TNF- α , IL6) afin de protéger la cellule des lésions d'IR.

a) Voie RISK : reperfusion injury salvage kinase

L'activation de la voie RISK par des effecteurs induits par des pré ou post-conditionnements ischémiques ou encore par des traitements médicamenteux [241] passe par l'activation de kinases dites de survie telles que PI3K-Akt ou encore MAPK-ERK1/2 via des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) [242] (figure 12). La voie PI3K/Akt est activée en réponse à de nombreux stimuli et à l'activation de récepteurs variés, notamment ceux couplés à une protéine G [243] ou les récepteurs aux hormones de croissance, et elle est impliquée dans divers processus cellulaires via la phosphorylation de nombreux substrats : glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), les protéines apoptotiques (Bax, Bad, Bim, p53 et les caspases), les GLUT, des facteurs de transcription, eNOS, et PKC [243]. Dans le contexte de la cardioprotection, PI3K active PDK qui phosphoryle Akt, qui a son tour phosphoryle eNOS et GSK3 β . eNOS phosphorylé va libérer du monoxyde d'azote pour activer le canal potassique mitochondrial et enfin inhiber l'ouverture du mPTP [244]. Une fois phosphorylé, GSK3 β devient inactif et contribue au blocage du mPTP [245]. La protéine kinase C epsilon active (PKC ϵ) va également entrer dans les mécanismes de survie cellulaire, en inactivant le mPTP et en inhibant des protéines pro-apoptotiques [246, 247].

b) Voie SAFE : survivor activating factor enhancement

La voie SAFE est régie par l'activation de STAT3 (Signal Transducer and Activator Transcription 3) via la reconnaissance du Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) sur des récepteurs spécifiques du TNF (TNFR2) [248]. La fixation du TNF- α sur son récepteur active la protéine tyrosine kinase JAK (Janus Kinase) qui phosphoryle à son tour le facteur de transcription STAT3. Cette phosphorylation va permettre la dimérisation et la translocation nucléaire de STAT3. Ce facteur de transcription participe à la cardioprotection en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl2) et au contraire en diminuant l'expression de facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bad) [249, 250] (Figure 12).

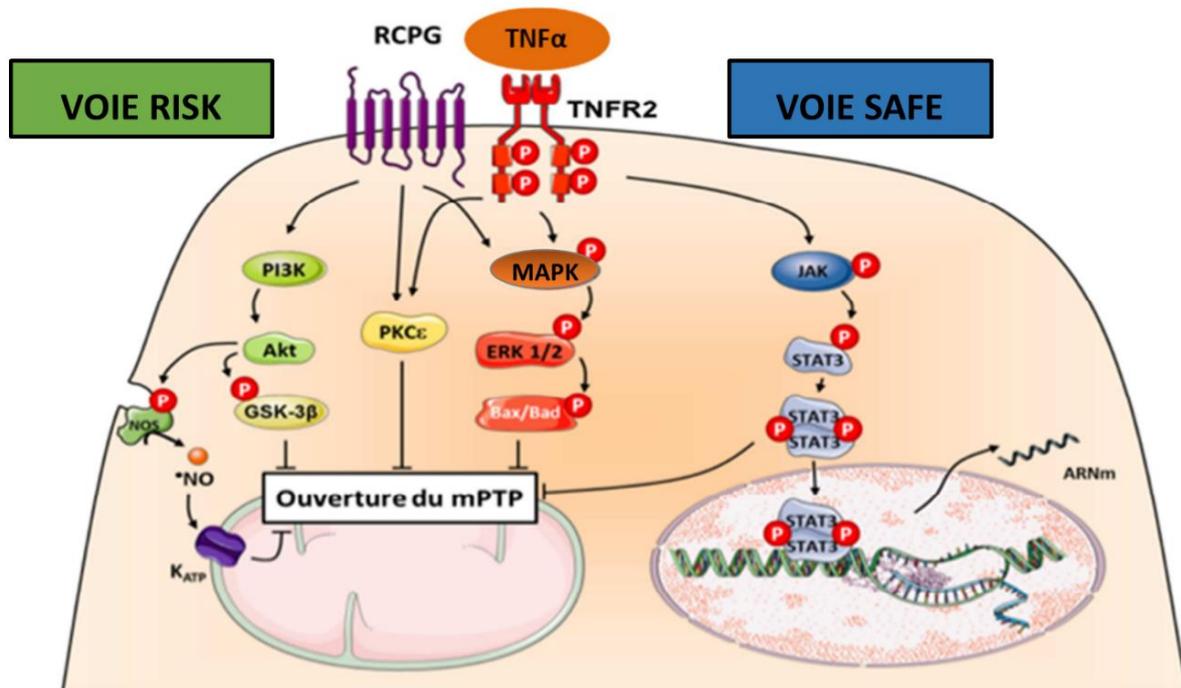


Figure 12 : Voies de cardioprotection RISK et SAFE. RCPG : récepteur couplé aux protéines G ; PI3K : phosphatidyl inositol 3 kinase ; GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β ; NOS : NO synthase ; NO : monoxyde d'azote ; PKC : protéine kinase C ; TNF- α : tumor necrosis factor α ; MAPK : mitogen activated protein kinase ; ERK 1 : extracellular signal-regulated kinase ; JAK : janus kinase ; STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3.

Les mécanismes qui permettent l'interaction entre ces deux voies de transduction sont encore mal définis ; cependant, plusieurs hypothèses ont déjà été proposées et suggèrent que le point de convergence entre la voie RISK et la voie SAFE serait finalement l'ouverture du mPTP [248, 251].

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

De nombreux travaux cliniques et expérimentaux ont montré que des modifications environnementales (nutritionnelles ou hormonales) pendant les périodes précoces de développement de l'individu (périodes fœtales et postnatales) peuvent prédisposer l'organisme à des maladies métaboliques et cardiovasculaires à l'âge adulte. Chez le rongeur, une SAPN peut être induite par la méthode de la réduction de la taille des portées juste après la naissance. De précédents travaux issus de notre laboratoire ont montré que les rongeurs élevés dans les portées de taille réduite développent un surpoids précoce et persistant à l'âge adulte, associé à divers désordres métaboliques : intolérance au glucose, résistance à l'insuline, hyperleptinémie, hypercholestérolémie, stress oxydant circulant et cardiaque. La SAPN altère également la fonction contractile cardiaque et augmente la sensibilité des cœurs aux lésions d'ischémie reperfusion induite *ex vivo*.

La majorité de ces études expérimentales a été réalisée sur de jeunes animaux mâles, âgés de 2 à 6 mois. Cependant, les maladies cardiovasculaires apparaissent chez l'Homme à partir de 50 ans, correspondant au dixième mois de vie chez la souris. **Ainsi, notre premier travail a été d'étudier chez des souris mâles l'impact à court (2 mois) et long terme (18 mois) d'une SAPN sur le risque cardio-métabolique.**

Les maladies cardiovasculaires touchent plus fréquemment les hommes que les femmes. Néanmoins, les MCV sont la principale cause de mortalité chez les femmes ; étant donné la sous-représentation du sexe féminin dans les études scientifiques, à la fois cliniques et expérimentales, il est tout à fait probable que le risque cardiovasculaire féminin soit notablement sous-estimé. Au regard des ces observations, **la deuxième partie de ce travail a été d'étudier le dimorphisme sexuel dans notre modèle de SAPN**, en incluant dans nos expérimentations des souris femelles âgées de 2 à 18 mois.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1/ Éthique

Toutes les procédures animales ont été examinées et approuvées par le comité d'éthique local (Comité d'Ethique en Expérimentation Animale, Université de Bourgogne Franche-Comté ; numéro d'accord de protocole : 16589) et conformes à la directive 2010/63/UE du Parlement européen et à la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals publié par les National Institutes of Health des États-Unis (Publication NIH n° 85–23, révisée en 1996). Le bien-être animal et notre souhait de minimiser la souffrance ressentie étaient au cœur de toutes les procédures expérimentales. Afin de respecter la règle des 3 R, le cadre de vie des animaux a été enrichi et les animaux ont été hébergés en groupe pour réduire le stress ressentis, et leur nombre a été limité au minimum nécessaire pour préserver la puissance statistique des analyses.

2/ Modèle expérimental de suralimentation postnatale

Des souris C57BL/6 femelles adultes (Charles River, L'Arbresle, France) ont été appariées avec des souris C57BL/6 mâles dans des cages individuelles pendant une semaine. Les souris mâles ont été retirées après une semaine et les groupes originaux de femelles ont été reconstitués. Quinze jours après l'accouplement, les femelles gestantes ont été placées en cage individuelle pour la mise bas. Tous les animaux ont reçu de l'eau et une alimentation standard en granulés *ad libitum* pendant la gestation et la lactation. Une fois la naissance effectuée, au deuxième jour de vie, les souriceaux mâles et femelles ont été répartis au hasard parmi les mères allaitantes pour réaliser un placement croisé, et la taille de la portée a été ajustée en fonction du groupe d'étude : le groupe de portée de taille normale (groupe NA) était composé de 9 souriceaux par mère, tandis que le groupe de suralimentation postnatale a été réduit à 3 petits par mère (portée réduite, groupe SAPN). Après le sevrage (24^{ème} jour de vie), les souris des deux groupes avaient libre accès à une alimentation standard (A03, SAFE Diets Augy, France) et à l'eau. Tout au long de la vie, le PC a été mesuré chaque semaine puis chaque mois. Les expérimentations ont été réalisées sur des souris mâles et femelles âgées de 2 mois à 18 mois.

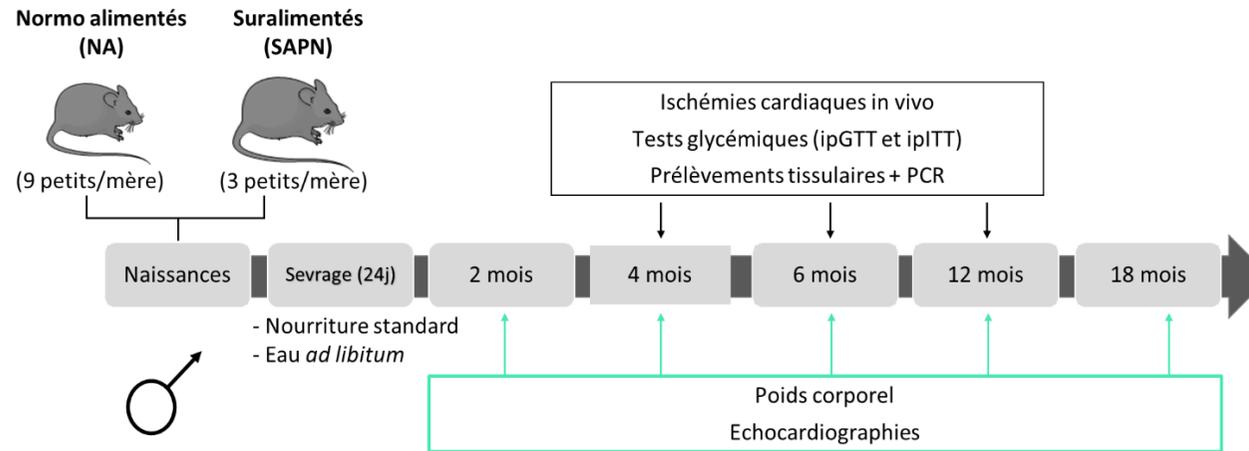


Figure 13 : Schéma expérimental de l'étude 1. NA : Normo alimentés ; SAPN : Suralimentés post natalement ; PCR : polymérase chain reaction ; ipGTT : intra péritonéal glucose tolerance test ; ipITT : intra péritonéal insulin tolerance test.

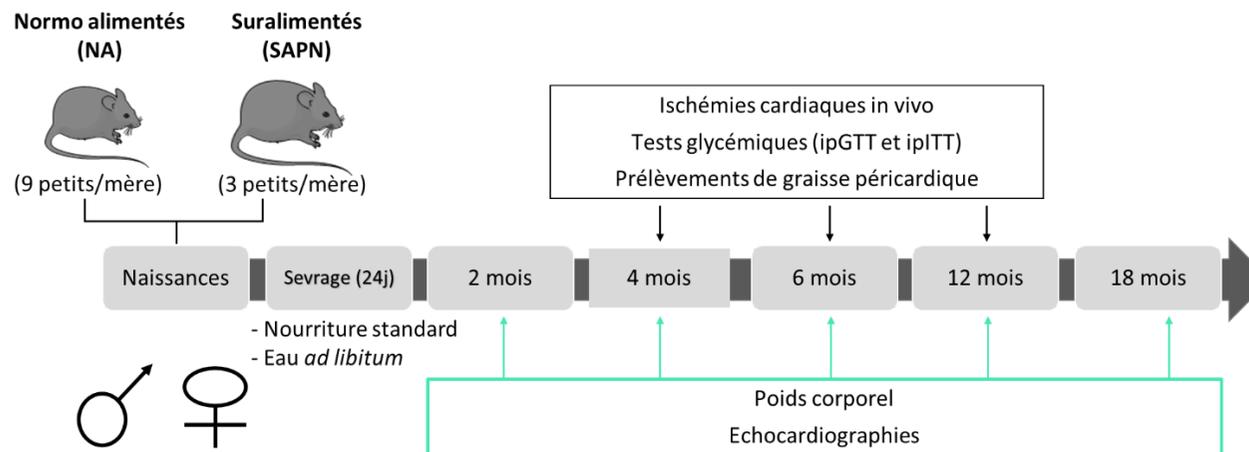


Figure 14 : Schéma expérimental de l'étude 2. NA : Normo alimentés ; SAPN : Suralimentés post natalement ; ipGTT : intra péritonéal glucose tolerance test ; ipITT : intra péritonéal insulin tolerance test.

3/ Exploration cardiaque

(a) Méthode d'échocardiographie

Une échocardiographie transthoracique a été réalisée consécutivement chez des souris mâles et femelles âgées de 2, 4, 6, 12 et 18 mois, à l'aide du système d'imagerie Vevo770TM (VisualSonics Inc., Toronto, Canada), doté d'une sonde de 30 MHz. Brièvement, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane en position supine et leur température corporelle a été maintenue à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ avec une lampe infrarouge. Les pattes des souris ont été positionnées sur des électrodes afin d'enregistrer l'électrocardiogramme. Le cœur a été visualisé en vue parasternale grand axe et petit axe du ventricule gauche (VG) (figure 15).

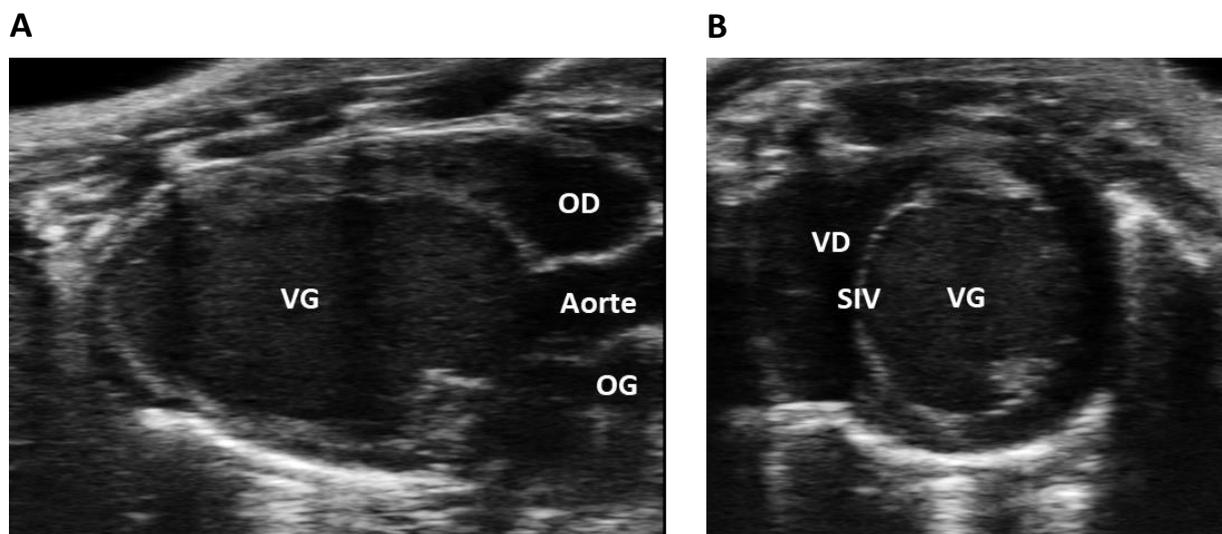


Figure 15 : Visualisation du ventricule gauche en coupe parasternale grand axe (A) et parasternale petit axe (B) en mode luminosité (B-mode) en fin de diastole. OD : oreillette droite ; OG : oreillette gauche ; VG : ventricule gauche ; VD : ventricule droit ; SIV : septum interventriculaire.

Le curseur du mode M a été positionné perpendiculairement à la paroi antérieure du VG afin de mesurer les diamètres télédiastoliques et télésystoliques ventriculaires gauches (LVEDD et LVESD, respectivement) au niveau des muscles papillaires sous la pointe de la valve mitrale, avec 3 mesures moyennées pour chaque coupe (figure 16).

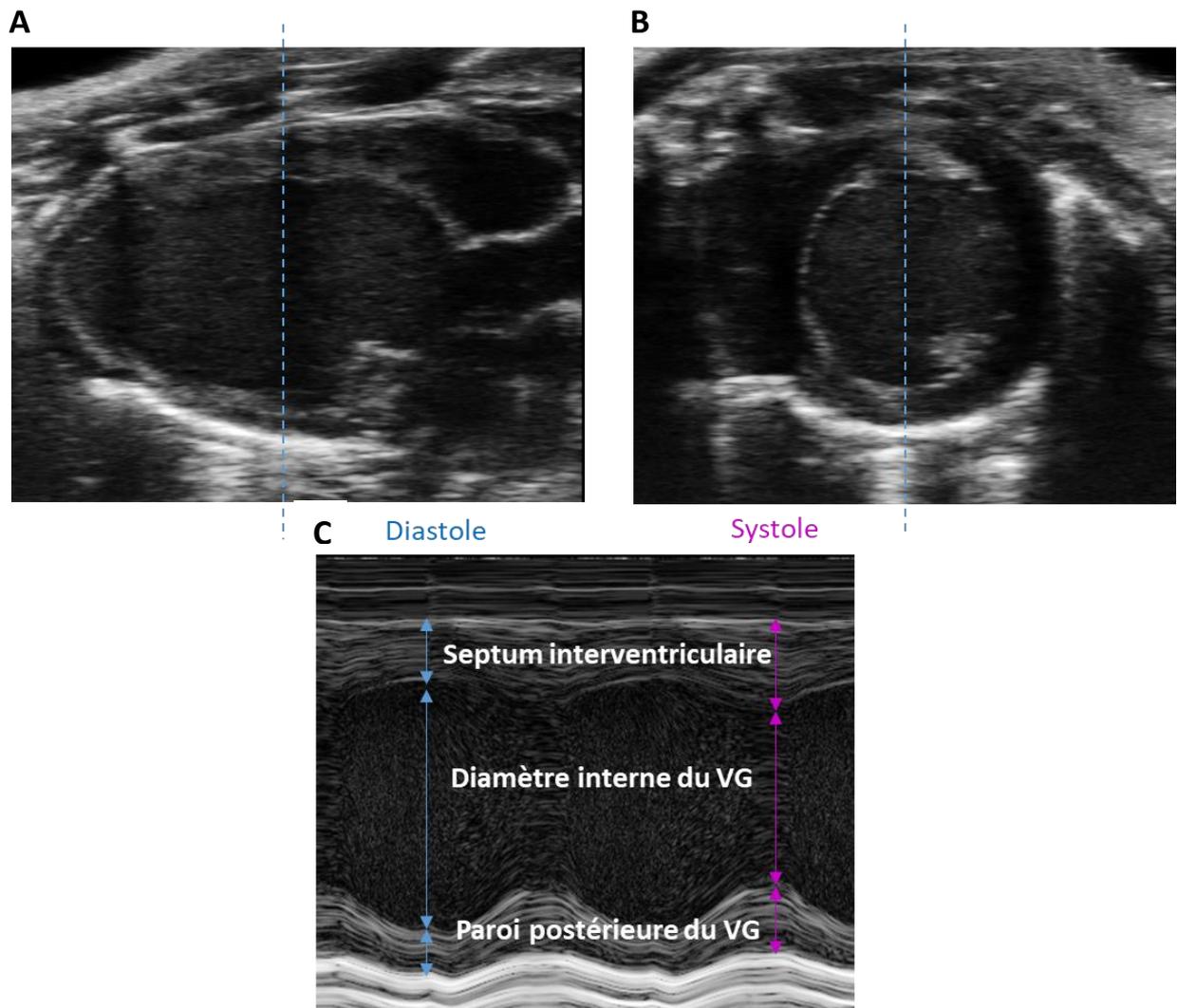


Figure 16 : Visualisation du ventricule gauche en coupe parasternale grand axe (A) et petit axe (B) en mode mouvement (M-mode, C) en fin de diastole.

L'enregistrement d'un Doppler pulsé et tissulaire permettant respectivement la mesure des ondes E et A et E' et A' représentatives de la fonction diastolique a été réalisé (figure 17). La mesure de ces ondes cardiaques a permis de calculer le ratio E/A pour évaluer la fonction diastolique globale, et le ratio E/e' pour la pression de remplissage du VG.

Enfin, la fréquence cardiaque, la fraction de raccourcissement (FR) et la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) ont été calculées [168] par le logiciel VEVOLAB.

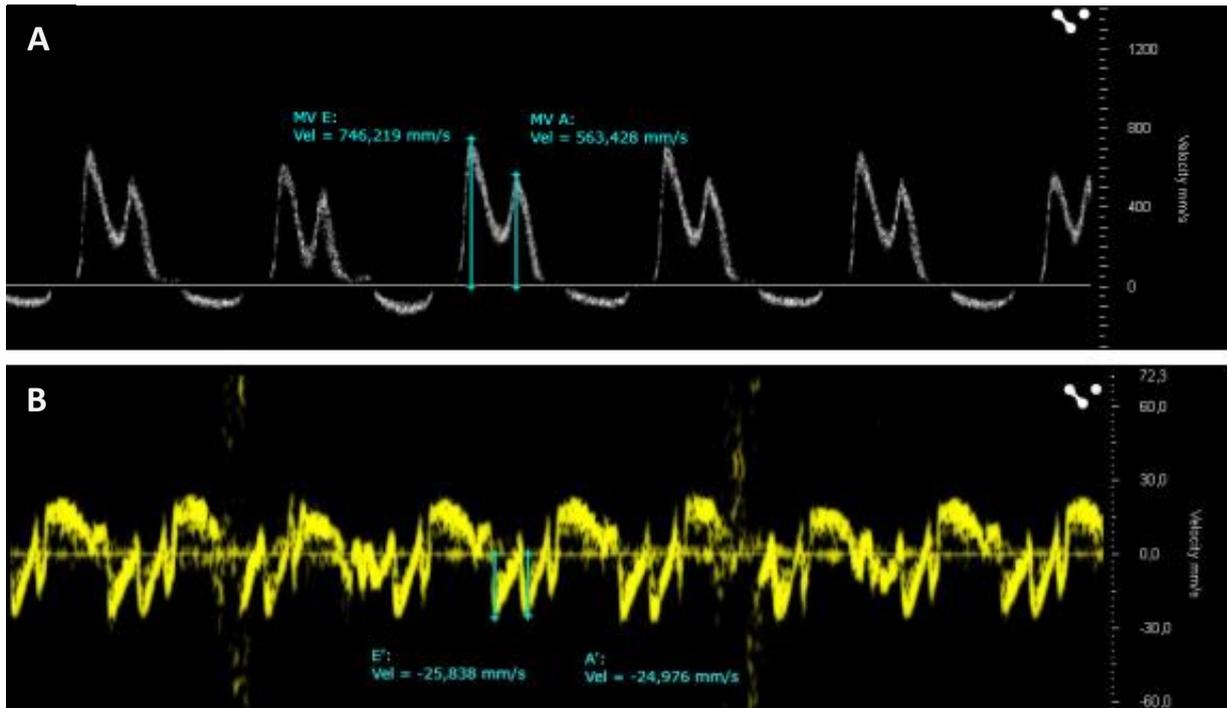


Figure 17 : Enregistrement de Doppler pulsé (A) et tissulaire (B) afin d'étudier les paramètres de la fonction diastolique par la mesure des ondes E, A, E' et A'.

(b) Méthode *in vivo* d'ischémie reperfusion cardiaque (ICIV)

Comme décrit précédemment [252, 253], l'ischémie myocardique a été obtenue par occlusion de l'artère coronaire descendante antérieure gauche (IVA). Brièvement, des souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (4% à l'induction puis 2,5 % pour le maintien de l'anesthésie), des électrodes ont été mise en place sur 3 des 4 pattes des animaux afin de monitorer l'électrocardiogramme (ECG) puis les animaux ont été placés sous ventilation artificielle à l'aide d'une canule d'intubation spécifique pour les souris (diamètre extérieur : 1,2 mm). Toutes les incisions ont été précédées de l'utilisation d'une crème analgésique (Anesderm Ge, 5%). Une fois la ventilation artificielle instaurée, une thoracotomie gauche a été réalisée afin d'exposer le ventricule gauche. L'artère coronaire IVA a été ligaturée à l'aide de fil chirurgical 8,0 pendant 45 minutes entraînant un sus-décalage du segment-ST visible sur l'ECG (figure 18B) et l'initiation des lésions ischémiques.

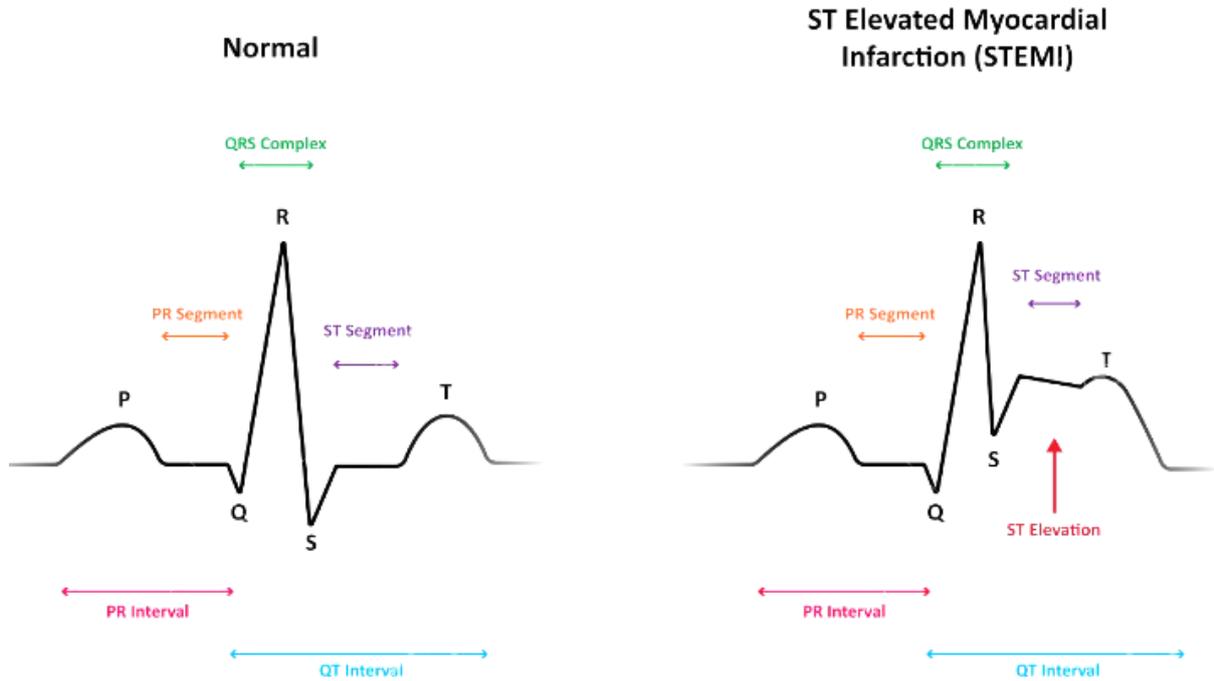


Figure 18 : Electrocardiogramme normal (A) et altéré par une ischémie cardiaque (B).

Ensuite, le nœud coulant a été desserré pour provoquer la reperfusion. La cage thoracique et les plans musculaires et cutanés ont été fermés avec du fil chirurgical 5,0 et les souris ont été réveillées et placées dans une couveuse pour une meilleure récupération post-opératoire. 24 heures après le début de la reperfusion, les souris ont été à nouveau anesthésiées, le thorax a été rouvert et les cœurs ont été traités soit pour évaluer la taille de l'infarctus, soit pour prélever des tissus. Par conséquent, deux séries d'expériences distinctes ont été réalisées sur des groupes différents de souris pour obtenir l'ensemble des résultats. Toutes les souris ont reçu deux doses de Buprénorphine (Buprecare, 0,075 mg/kg) afin de limiter les douleurs liées à la chirurgie.

(c) Détermination de la zone myocardique à risque et de la taille de l'infarctus

Vingt-quatre heures après la reperfusion, chez des souris anesthésiées à thorax ouvert, l'IVA a été réoccluse et la zone myocardique à risque (AAR) a été déterminée en injectant du bleu Evans (1%) dans la circulation sanguine. Tous les tissus perfusés étaient ainsi colorés en bleu, à l'exception de l'AAR. Le cœur a été rapidement retiré et découpé en sections de 1 mm d'épaisseur, parallèles à l'axe transverse du ventricule gauche. Une première acquisition

d'images a été réalisée afin de quantifier l'AAR, puis les tranches ont été incubées dans 2% de Chlorure de Triphényl Tétrazolium (TTC) à 37°C pendant 20 min suivi par 10% de Formol pendant 45 min. Une deuxième série d'images a été réalisée afin de quantifier la zone de l'infarctus (TI : taille de l'infarctus). Toutes les images ont été traitées avec le logiciel image J. L'AAR et la surface correspondante à la zone infarctée ont été calculées en pourcentage du ventricule gauche.



Figure 19 : Coupes de cœurs marqués au bleu Evans (A) et au TTC (B) pour la quantification de l'AAR et de la taille d'infarctus.

(d) Prélèvement de sang et de tissus

Des échantillons de sang et de tissus (TAP, VG) ont été collectés pour des expériences biologiques moléculaires. Les VG ont été collectés chez des souris intactes et après une séquence d'ischémie reperfusion. Dans ce dernier cas, le VG était séparé en deux morceaux : le premier contenait l'AAR (y compris la zone infarctée) et la zone frontalière de l'AAR, et le second correspondait à la zone éloignée non ischémique (RZ : remote zone). Tous les échantillons ont été stockés dans des tubes Eppendorf séparés, surgelés dans de l'azote liquide et conservés à -80 ° C.

4/ Tests glycémiques

Des tests intrapéritonéaux de tolérance au glucose (ipGTT) et des tests de tolérance à l'insuline (ipITT) ont été réalisés respectivement à 4, 6 et 12 mois sur des souris mises à jeun depuis 6 heures. La glycémie a été mesurée à l'aide d'un glucomètre. Deux prélèvements sanguins au niveau de la veine caudale des souris ont précédé l'injection de glucose ou d'insuline afin d'évaluer le statut glycémique basal des animaux (temps 0). Comme décrit précédemment [168], pour les GTT, une injection intrapéritonéale de glucose (2 g/kg) a été réalisée et des gouttelettes de sang ont été prélevées aux temps 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 et

120 min après l'injection. Pour les ITT, les souris ont reçu une injection de 0,75 UI/kg d'insuline recombinante humaine (Actrapid®, Novo Nordisk, France) et la glycémie a été déterminée aux mêmes points que pour les GTT.

5/ Mesures de biologies moléculaires : réactions quantitatives en chaîne par polymérase en temps réel (rt-qPCR)

L'ARN total d'échantillons de VG congelés a été extrait par le réactif Nucleozol (Ensemble d'ARN NucleoSpin® pour NucleoZOL MACHEREY-NAGEL). L'ARNm (1 µg) a été soumis à une transcription inverse avec le kit de réactifs PrimeScript tm RT avec gDNA Eraser (Takara). Une réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel (RT-qPCR) a été réalisée avec 2 µl d'ADNc en utilisant le SYBR-Green PCR Master-Mix (Applied Biosystems) et des amorces sens et antisens (5 mM) dans un volume final de 20 µL, dans un système de PCR en temps réel StepOne (Applied Biosystems). Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de souris sont fournies dans le tableau 1. L'expression du gène cible a été normalisée par rapport à l'expression du gène de la β-actine puis calculée avec la méthode des $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Nom du gène	Séquence sens	Séquence anti-sens
β -actine	5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3'	5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3'
Activine A	5'-GGGGAGAACGGGTATGTGGA-3'	5'-CCTGACTCGGCAAAGGTGAT-3'
IL-6	5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3'	5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'
IL-1 Béta	5'-TTCAGGCAGGCAGTATCACTC-3'	5'-GAAGGTCCACGGGAAAGACAC-3'
TNA alpha	5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'	5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG-3'
STAT3	5'-CTTCAGACCCGCCAACA-3'	5'-TAGGACACTTTCTGCTGC-3'
Akt	5'-CCACGCTACTTCCTCCTC-3'	5'-CATCCTGAGGCCGTTCC-3'
Erk1	5'-GGTAGACCGTTCTGGAATG-3'	5'-GCAGAGCCCTACTCAGTG-3'
GSK3- β	5'-TGTTCTATGTGACTTGGTTTG-3'	5'-CAGAGTGGGAAGGGTGAA-3'
PI3K	5'-TTGTGGCGTCATAGATTGTGG-3'	5'-GTAACCTACCTAGCCCTTTGTGC-3'

Table 1 : Séquence des amorces des gènes cibles utilisés pour l'exploration moléculaire par rt-qPCR

6/ Tests ELISA

(a) Activine A

L'homodimère d'activine A a été mesuré par ELISA (systèmes R&D, DAC00B) grâce à une technique d'immunodosage enzymatique sandwich quantitatif en 3 étapes. Brièvement, l'anticorps de capture est biotinylé et lié à des plaques revêtues de streptavidine. Les plaques ont été lavées et le diluant de dosage, les standards et les échantillons ajoutés dans les puits. L'activine A présente dans ces différents échantillons a été fixée à l'anticorps immobilisé au fond des puits. Après avoir éliminé toutes les substances non liées, un conjugué HRP spécifique de la sous-unité β A a été ajouté à chaque puits. Après un lavage pour éliminer tout conjugué non lié, une solution de substrat a été ajoutée aux puits et la couleur s'est développée proportionnellement à la quantité d'activine A liée. Le développement de la couleur a été arrêté et l'intensité de la couleur a été mesurée à 450 nm. La sensibilité moyenne

était de 3,67 pg/mL. Les coefficients de variation (CV) moyens intra et inter-essais du test étaient respectivement de 4,3 % et 5,9 %.

(b) Multiplex : Luminex discovery Assay: IL-6, TNF- α and IL-1 β

Nous avons utilisé un kit multi-analytes prémélangés pour souris (LXSAMSM) afin de détecter simultanément certains biomarqueurs de l'inflammation dans le plasma de souris. Des anticorps spécifiques à l'analyte (IL-6, TNF- α et IL-1 β) ont été pré-enduits sur des microparticules magnétiques fixées avec des fluorophores à des ratios définis pour chaque région de billes unique. Des microparticules, des standards et des échantillons ont été ajoutés dans les puits et les anticorps immobilisés se sont liés aux analytes d'intérêt. Les substances non liées ont été éliminées par lavage et un cocktail d'anticorps biotinylés spécifiques aux analytes d'intérêt a été pipeté dans chaque puits. Après un lavage pour éliminer tout anticorps biotinylé non lié, un conjugué streptavidine-phycoérythrine (Streptavidine-PE), qui se lie à l'anticorps biotinylé, a été ajouté à chaque puits. Les lavages finaux ont éliminé la streptavidine-PE non liée, les microparticules ont été remises en suspension dans un tampon et lues à l'aide de l'analyseur Bio-Rad Bio-Plex. Cet analyseur utilise un laser pour exciter les colorants à l'intérieur de chaque bille afin d'identifier la région de la bille et un deuxième laser pour exciter le PE afin de mesurer la quantité d'analyte liée à la bille. Toutes les émissions de fluorescence de chaque bille lors de son passage à travers la cellule de détection ont ensuite été analysées pour différencier les niveaux d'émission à l'aide d'un tube photomultiplicateur (PMT) et d'une photodiode à avalanche.

(c) Dosage immuno-enzymatique (ELISA) du GDF-15 souris/rat

Ce test utilise la technique de dosage immuno-enzymatique quantitatif en sandwich. Un anticorps monoclonal spécifique du GDF-15 (Growth differentiation factor 15) de souris/rat a été pré-enduit sur une microplaque. Des étalons, des contrôles et des échantillons ont été ajoutés dans les puits et tout le GDF-15 présent a été lié à l'anticorps immobilisé. Après avoir éliminé toutes les substances non liées, un anticorps polyclonal lié à une enzyme spécifique du GDF-15 de souris/rat a été ajouté aux puits. Après un lavage pour éliminer tout le complexe anticorps-enzyme non lié, une solution de substrat a été pipetée dans les puits.

La réaction enzymatique développe un produit bleu qui devient jaune lorsque la solution d'arrêt est ajoutée. L'intensité de la couleur mesurée était proportionnelle à la quantité de GDF-15 liée lors de l'étape initiale. Les valeurs des échantillons ont ensuite été lues sur la courbe standard.

7/Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM) ou sous forme de médiane \pm valeurs min et max. La normalité des données a été vérifiée : en cas de distribution Gaussienne, un test-t de Student ou une ANOVA unidirectionnelle (pour suivre l'évolution dans le temps) ont été effectués ; si la distribution des données ne suivait pas une loi normale, un test de Mann-Whitney ou une ANOVA unidirectionnelle ont été réalisés. La signification statistique a été fixée à $p < 0,05$. Les données ont été analysées à l'aide de GraphPadPrism.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Article 1 : Impact à court et long terme d'une SAPN sur le risque cardiométabolique et la sensibilité du cœur aux lésions d'ischémie reperfusion cardiaque in vivo chez la souris

Article en cours de soumission dans un journal d'audience internationale

Introduction

Les principaux facteurs de risque cardiovasculaires chez l'Homme sont liés au vieillissement, à l'hypertension artérielle, au déséquilibre glucose/insuline, à la dyslipidémie, au surpoids/obésité associé à une accumulation de graisse viscérale. Ainsi, l'augmentation de la graisse épigardique joue un rôle dans le développement de la fibrillation atriale et de la fibrose cardiaque [82, 171]. Les modèles précliniques pertinents, correspondant aux caractéristiques cliniques du syndrome métabolique tel qu'il s'exprime chez l'Homme sont rares, et la majorité des données expérimentales, a été obtenue chez de jeunes souris mâles âgées de 2 à 4 mois.

L'environnement nutritionnel au cours de la période périnatale joue un rôle essentiel dans l'orientation permanente de l'expression des gènes chez le fœtus ou le nouveau-né, et s'avère déterminant dans l'orientation ultérieure de la santé cardiovasculaire et métabolique d'un individu [97, 133]. Ce concept, nommé « Origines développementales de la santé et de la maladie » (DOHaD), établit une relation entre l'environnement périnatal et une susceptibilité accrue aux maladies chroniques, introduisant le concept d'un individu « programmé » pour un certain phénotype à l'âge adulte. [97-100]. Dans ce contexte, l'impact de la suralimentation postnatale (SAPN) peut être exploré chez les rongeurs par le modèle de réduction de la taille des portées [172-174]. Notre équipe de recherche a démontré que la SAPN induisait une augmentation précoce du poids corporel au sevrage (+20-30 %) qui persistait pendant la croissance et la maturité (6 mois, +15-20 %) et était associée à des troubles métaboliques, en particulier à des anomalies de la régulation du glucose et de l'adiposité centrale [111, 131, 175]. La fonction cardiaque était également altérée par la SAPN : le stress oxydant myocardique et les dépôts de collagène étaient augmentés alors qu'une diminution progressive de la fraction d'éjection ventriculaire gauche était observée chez les souris âgées de 6 à 7 mois. Enfin, *ex vivo*, le cœur des souris PNOF était plus sensible aux lésions d'ischémie-reperfusion [114]. Cependant, ce modèle de SAPN, regroupant les nombreuses caractéristiques du syndrome métabolique, n'a jusqu'à présent été étudié que chez de jeunes rongeurs, ce qui limite sa pertinence clinique.

Par conséquent, le but de cette étude était d'évaluer l'impact à long terme d'une SAPN sur le système cardiovasculaire, en évaluant les modifications de la fonction contractile cardiaque, la sensibilité cardiaque aux lésions d'ischémie-reperfusion (IR) induites *in vivo*, le

remodelage métabolique du tissu adipeux péri-cardique et le métabolisme du glucose chez des souris mâles jeunes (4 mois), adultes (6 mois) et matures (12 mois).

Short-term postnatal overfeeding induces long-lasting cardiometabolic syndrome in mature and old mice associated with increased sensitivity to myocardial infarction

Eve Rigal¹, Marie Josse¹, Camille Greco¹, Nathalie Rosenblatt³, Luc Rochette¹, Charles Guenancia^{1,2}, Catherine Vergely^{1}*

¹Research Team: Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires (PEC2), Université de Bourgogne, Faculté des Sciences de Santé, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France

²Cardiology department, University hospital of Dijon, France

³Division of Angiology, Heart and Vessel Department, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Switzerland

*Corresponding author: email address: cvergely@u-bourgogne.fr; Tel: +33-380 393 460

Abstract

Nutritional disturbances during the perinatal period may be responsible for a predisposition, or “programming”, of increased cardio-metabolic risk in adulthood. Reducing rodent litter size increases transiently postnatal nutrition and has been associated with the early onset of deleterious cardiovascular and metabolic processes. However, it is still unknown whether postnatal overfeeding (PNOF) also impacts in the long term cardiovascular and metabolic risk in mature and/or old animals, and thus could be used as a « physiological » model of metabolic syndrome and its cardiovascular consequences

Our aim was to evaluate the impact of PNOF on cardiac function, cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion (I-R) injury *in vivo*, glucose metabolism and on metabolic profile of pericardial adipose tissue (PAT) in young (4 months), adult (6 months), old (12 months) and very old (18 months) male mice.

PNOF was induced by litter size reduction of C57BL/6 mice 2 days after birth: normally-fed group (NF) was composed of 9 male pups/mother and postnatally overfed group (PNOF) of 3 pups/mother. Glucose tolerance and insulin resistance tests were performed in 2 to 12 months old mice and echocardiography were realized at all ages. An *in vivo* myocardial ischemia-reperfusion (I-R) injury was induced by the ligation of the left anterior descending coronary artery for 45 minutes followed by 24 h of reperfusion in 4, 6 and 12 months old mice. PAT, heart tissue and blood sample were harvested.

PNOF induced an early and permanent 10-20 % increase of body weight, independently of mice's age. Echocardiographic measurements showed an alteration of myocardial contractile function in PNOF mice aged from 4 months up to 18 months, as evidenced by a 9-11 % decrease of the left ventricular ejection fraction. Moreover, PNOF induced a 27-34% increase of infarct size after *in vivo* I-R at 4, 6 months and 12 months. PNOF mice also presented glucose intolerance and insulin resistance from 4 months up to 12 months of age. Finally, 6 and 12 months-old PNOF mice had a higher PAT mass indexed to body weight with increased inflammatory status and decreased activin A gene expression.

To conclude, nutritional programming through short-term PNOF induced long-lasting (up to 12-18 months) alterations of glucose metabolism and of cardiac contractility in male mice. Moreover, mice submitted to PNOF developed higher susceptibility to myocardial I-R injury *in*

vivo at any age associated with a higher mass and inflammatory status of PAT. Therefore, PNOF corresponds to a relevant experimental model of programmed metabolic syndrome. Finally, litter size appears a strong determinant of long-term cardio-metabolic status; accordingly, adjusting litter size in rodent's group may be a necessary prerequisite in experimental procedures aimed at evaluating cardiometabolic function.

Key-words: postnatal programming, metabolic syndrome, ischemia-reperfusion injury, insulin resistance, pericardial adipose tissue.

Introduction

Major risk factors of cardiovascular diseases in humans are related to aging, high blood pressure, glucose/insulin imbalance, dyslipidaemia, overweight/obesity associated with visceral fat deposit. For instance, increased epicardial fat plays a role in the development of atrial fibrillation and cardiac fibrosis [1, 2]. Preclinical models corresponding to the clinical features of metabolic syndrome are scarce, and the majority of experimental studies, including ours, were obtained in young male mice of 2 to 4 months old.

The nutritional environment during the perinatal period plays an essential role in permanently shaping gene expression in the foetus or new-born, which will be determinant in the subsequent orientation of an individual's cardiovascular and metabolic health [3, 4]. This concept is generally referred to as the “Developmental Origins of Health and Disease” (DOHaD) and establishes a relationship between the perinatal environment and increased susceptibility to chronic diseases, introducing the concept of an individual being 'programmed' to a certain phenotype in adulthood [4-7]. In this context, the impact of postnatal overfeeding (PNOF) can be explored in rodents with the model of litter size reduction [8-10]. Our research team and others have demonstrated that PNOF induced an early increase in body weight at weaning (+20-30%) that persisted during growth and maturity (6 months of age, +15-20%), and was associated with metabolic disorders, in particular abnormalities in glucose regulation and central adiposity [11-13]. Cardiac function was also impaired by PNOF: myocardial oxidative stress and collagen deposit were increased whereas a progressive decrease in left ventricular ejection fraction was observed in mice aged 6-7 months, and, ex vivo, the heart of PNOF mice was more sensitive to ischemia reperfusion injury [14]. However, unlike the pathophysiology of metabolic syndrome and its cardiovascular consequences in humans, which affect middle-aged to elderly patients, this PNOF model of metabolic syndrome has so far only been developed in young rodents, which limits its clinical relevance.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the long-term impact on cardiovascular system of a short-term PNOF, by assessing cardiac contractile function changes, in vivo cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion (IR) injury and pericardial adipose tissue metabolic remodeling in young (4 months), adult (6 months) and mature (12 months) male mice.

Material and methods

Ethics

All animals' procedures were reviewed and approved by the local ethics' committee (Comité d'Éthique en Expérimentation Animal, Université de Bourgogne Franche-Comté; protocol agreement number: 16589) and conformed to Directive 2010/63/EU of the European Parliament and to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No, 85–23, revised 1996). Animal welfare was the priority of all procedures to minimize the perceived suffering. For instance, their living environment has been enriched and animals were housed in groups.

Animals model

Adult female C57BL/6J mice (Charles River, L'Arbresle, France) were paired with male C57BL/6J mice in individual cages during one week after which male mice were removed and the original groups of females reconstituted. Fifteen days after coupling, gravid females were isolated in individual cages for parturition. All animals received water and a standard pellet diet *ad libitum* during pregnancy and lactation. After delivery, on the second day of life, male pups were randomly distributed among the mothers to achieve cross fostering and the litter size was adjusted according to the study group: normal litters were composed of 9 male pups leading to postnatally normally-fed pups (NF groups) whereas postnatal overfed litter groups (PNOF groups) were reduced to 3 pups per mother (small litter). Excess pups were rapidly killed by decapitation. After weaning (day 24 of life, D24), mice of both groups had free access to a standard diet (A03, SAFE Diets Augy, France) and water. Throughout life, body weight was measured weekly then monthly up to 18 months of age.

Echocardiography

Transthoracic echocardiography was consecutively performed in 2, 4, 6, 12 and 18-month-old male mice, using the Vevo770™ imaging system (VisualSonics Inc., Toronto, Canada), endowed with a 30 MHz probe. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane and their body temperature was maintained at $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ with an infrared lamp. The heart was imaged in the long-axis and short-axis view of the left ventricle (LV), with 3 measurements for each view to

make an average. The cursor of the M mode was positioned perpendicular to the anterior wall to measure left ventricular end-diastolic and end-systolic diameters (LVEDD and LVESD, respectively) at the level of papillary muscles below the mitral valve tip. Heart rate and left ventricular ejection fraction (LVEF) were calculated [168] such as, E/A, E/e' and the ratio of the left ventricular mass on the body weight.

In vivo myocardial ischemia reperfusion

As previously described [252, 253], myocardial infarction was achieved by occlusion of the left anterior descending (LAD) coronary artery. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane (4 then 2%) and placed under artificial ventilation with a specific mouse intubation cannula (outer diameter: 1.2 mm) before opening the chest. All incisions were preceded by the use of analgesic cream (Anesderm Ge, 5%). Once ventilated, a left thoracotomy wherein the pericardium was opened to expose the left ventricle was performed. The LAD coronary artery was ligated using 8.0 surgical thread for 45 minutes, in order to induce ischemic damage. Then, the slipknot was loosened to induce reperfusion. The chest was closed with 5.0 surgical thread and mice were awakened and placed in an incubator for better post-surgery recovery. All mice received two injections of buprenorphine (Buprecare, 0.075 mg/Kg) to limit the pain. 24 h after the beginning of reperfusion, mice were anesthetized again, the chest was reopened and hearts were processed either for evaluation of infarct size, or for tissue sampling. Therefore, two separate sets of experiments were performed in distinct mice to obtain results.

Determination of myocardial area at risk and infarct size

Twenty-four hours after reperfusion, in open-chest anesthetized mice, the LAD was re-occluded and the myocardial area at risk (AAR) was determined by injecting Evans blue (1%) in the bloodstream. All perfused tissues appeared stained in blue, except the AAR. The heart was quickly removed and was cut in 1 mm thick sections parallel to the short axis of the left ventricle. A first acquisition of images was made to quantify the AAR, and then, the slices were incubated in 2% of Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) at 37°C for 20 mins followed by 10% formalin for 45 mins. A second round of images was performed to quantify the infarct size (IS), All images were treated with image J software. The AAR and the area corresponding to the IS were calculated as a percentage of the left ventricle.

Blood and tissues harvesting

Blood and tissues samples (pericardial adipose tissue (PAT), left ventricle) were collected for biological molecular experiments. Left ventricles were collected in intact mice. All samples were stored in separate Eppendorf tubes, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C awaiting further experiments.

Glycaemic tests: ipGTT and ipITT

Intraperitoneal glucose tolerance tests (ipGTTs) and insulin tolerance tests (ipITTs) were carried out at 4, 6 and 12 months of age, respectively, after 6 hours of fasting. Blood glucose level was measured using a glucometer. As previously described [168] for GTTs, an intraperitoneal injection of glucose (2 g/kg) was administered, and blood droplets were collected twice from the tail vein just prior to glucose administration (time 0) and at 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 min following the injection. For ITTs, mice were injected with 0.75 IU/kg human recombinant insulin (Actrapid[®], Novo Nordisk, France) and blood glucose was determined at the same points as for the GTTs. Evolution of blood glucose was made for each group and at all ages.

Real time quantitative Polymerase Chain Reactions (rt-qPCR)

Total RNA was extracted from frozen left ventricle and PAT samples by Nucleozol reagent (NucleoSpin[®] RNA Set for NucleoZOL MACHEREY-NAGEL), mRNA (1 μg) was reverse transcribed with PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed with 2 μl of cDNA using the SYBR-Green PCR Master-Mix (Applied Biosystems) and both sense and antisense primers (5 mM) in a final volume of 20 μL , in a StepOne-Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The primers used for the amplification of mouse genes are provided in Table 1. Data were analysed using relative quantification, normalized against actin beta mRNA as the house keeping gene and presented as fold change compared to 4 months NF mice sample.

ELISA quantification of activin A

The activin A homodimer was measured by ELISA (R&D systems, DAC00B) in a 3-step quantitative sandwich enzyme immunoassays technique. Briefly, the capture antibody was biotinylated and bound to streptavidin-coated plates. The plates were washed, and assay diluent, standards, and samples were pipetted into the wells and any activin A present was bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an HRP-conjugate specific for the β A subunit was added to each well. Following a wash to remove any unbound conjugate, a substrate solution was added to the wells and colour developed in proportion to the amount of activin A bound. The colour development was stopped, and the intensity of the colour was measured at 450 nm. The mean sensitivity was 3.67 pg/mL. The mean intra- and inter assay coefficients of variation (CV) of the assay were 4.3% and 5.9% respectively.

Luminex discovery Assay: interleukin 6, tumor necrosis factor α and interleukin 1 β

We used mouse premixed multi-analyte kit (LXSAMSM) to simultaneously detect some inflammation biomarkers in mice plasma. Analyte-specific antibodies (IL-6, TNF- α and IL-1 β) were pre-coated onto magnetic microparticles fixed with fluorophores at set ratios for each unique bead region. Microparticles, standards and samples were added into wells and the immobilized antibodies bound the analytes of interest. The unbound substances were eliminated by washing and a biotinylated antibody cocktail specific to the analytes of interest was pipetted to each well. Following a wash to remove any unbound biotinylated antibody, streptavidin-phycoerythrin conjugate (Streptavidin-PE), which binds to the biotinylated antibody, was added to each well. Final washes removed unbound streptavidin-PE, the microparticles were resuspended in buffer and read using the Bio-Rad Bio-Plex analyser. Bio-Rad Bio-Plex uses one laser to excite the dyes inside each bead to identify the bead region and the second laser to excite the PE to measure the amount of analyte bound to the bead. All fluorescence emissions from each bead as it passes through the flow cell was then analysed to differentiate emission levels using a Photomultiplier Tube (PMT) and an Avalanche Photodiode.

Mouse/Rat GDF-15 Immunoassay

This assay uses the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. A monoclonal antibody specific for mouse/rat GDF-15 had been pre-coated onto a microplate. Standards, control, and samples were added into the wells and any GDF-15 present was bound to the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for mouse/rat GDF-15 was added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution was pipetted to the wells. The enzyme reaction showed a blue product that turns yellow when the stop solution was added. The intensity of the colour measured was in proportion to the amount of GDF-15 bound in the initial step. The sample values were then read off the standard curve.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of mean (ESM) or median \pm min to max values. The statistical significance of differences between two means was determined by a Student's t-test or by Mann Whitney test for medians comparison. For tracking variables over time, one-way ANOVA was performed to investigate differences between two groups. Statistical significance was set at $p < 0.05$. The data were analysed using GraphPadPrism.

Results

PNOF induced early and permanent increase in body weight

PNOF induced early and permanent increase in body weight (Figure 1). At weaning (D24), the body weight of PNOF group was 20 % greater than the NF group (13.82 ± 0.18 g, n = 128 vs, 11.08 ± 0.15 g, n = 144, $p < 0.001$). This difference persisted in juvenile (2 months, + 10 % increase: 27.84 ± 0.19 g, n = 116 vs 25.16 ± 0.15 g, n = 129, $p < 0.001$) young (4 months, + 13 % increase: 34.71 ± 0.29 g, n = 101 vs 30.14 ± 0.19 g, n = 117, $p < 0.001$), adult (6 months, + 14 % increase: 38.59 ± 0.47 g, n = 70 vs 33.00 ± 0.28 g, n = 75, $p < 0.001$), mature (12 months, +17 % increase: 46.66 ± 0.90 g, n = 41 vs 38.50 ± 0.70 g, n = 43, $p < 0.001$) and even in old mice (18 months of age, + 9 % increase, 40.94 ± 0.99 g vs, 37.1 g ± 1.12 g, n=5 mice per group, $p < 0.001$).

PNOF induced early and permanent decrease in cardiac contractile function

Consecutive echocardiographic measurements showed an alteration of left ventricular contractile function in PNOF mice from 4 months up to 18 months of age, with an average LVEF decrease of -9 to -11 % for PNOF males compared to NF groups (4 months: NF= 64.63 ± 1.30 % vs PNOF= 57.25 ± 0.84 %, $p < 0.01$; 6 months: NF= 64.38 ± 1.58 % vs PNOF= 58.38 ± 1.27 %, $p < 0.05$; 12 months: NF= 67.10 ± 1.15 % vs PNOF= 61.39 ± 1.24 %, $p < 0.05$; 18 months: NF= 65.20 ± 0.73 % vs PNOF= 58.00 ± 1.52 %, $p < 0.05$) (figure 2). We did not observe any alterations of other parameters accounting for LV dimensions, systolic or diastolic function (table 2).

PNOF induced increased susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion injury in vivo

After an *in vivo* 45-min cardiac ischemia followed by 24 hours of reperfusion, the area at risk (AAR) were similar in all groups at all ages (4 months: NF = 47.76 ± 1.17 %, PNOF = 50.35 ± 1.38 %, $p < 0.05$; 6 months: NF = 50.02 ± 1.60 %, PNOF = 49.19 ± 1.35 %, $p < 0.001$; 12 months: NF = 51.06 ± 1.65 %, PNOF = 48.33 ± 2.34 %, $p < 0.05$), which allowed us to rigorously compare the results concerning infarct sizes (figure 3A). We observed a significant increase of the infarct size in hearts of PNOF group in mice aged 4 months (+27%, NF: 38.30 ± 3.99 %, PNOF: 52.74 ± 2.96 %, $p < 0.05$), 6 months (+34%, NF: 38.69 ± 2.32 %, PNOF: 58.37 ± 4.52 %, $p < 0.001$)

and 12 months (27%, NF: 36.21 ± 3.72 , PNOF: 49.93 ± 3.47 , $p < 0.05$) as compared to the NF group (figure 3B).

PNOF induced early and permanent alteration in glucose and insulin tolerance

At 2, 4, 6 and 12 months of age, glucose and insulin tolerance tests were performed in mice after 6 hours of fasting. From the age of 4 months, PNOF mice presented greater glycemia after intraperitoneal injection of glucose or insulin, as evidenced by higher areas under the curve of glycemia during the experiments (in PNOF group mice: *ip*GTT: 4 and 6 months: +13%, $p < 0.05$; 12 months: +18%, $p < 0.05$; For *ip*ITT: 4 months: +16%, $p < 0.05$; 6 months: +35%, $p < 0.01$; 12 months: 30%, $p < 0.05$) (figure 4). We also observed a transient higher fasting glycemia in the PNOF group mice as compared to the NF, but only at 6 months of age (data not shown, $p < 0.001$).

PNOF induced increase in pericardial adipose tissue mass and inflammatory status

The pericardial adipose tissue (PAT) weight was adjusted to body weight. In PNOF mice, the pericardial fat mass was higher at 6 (+30%, $p < 0.01$) and 12 months of age (+25%, $p < 0.001$) as compared to the NF group (figure 5A).

Gene expression of Activin A in pericardial adipose tissue was decreased in the PNOF group compared to the NF group at 12 months (-56%, $p < 0.05$), and a non-significant trend to decrease over time was found in PNOF mice (-41% from 4 to 12 months, $p = 0.413$) (figure 5B). Gene expression of TNF- α in pericardial fat mass was increased in PNOF group at 4 (+40%, $p < 0.05$) and 12 months (+76%, $p < 0.05$) as compared to the NF group (figure 5D). Moreover, IL-6 gene expression was also increased with time in the PNOF group (+99% from 4 to 12 months, $p < 0.05$) and was significantly higher in PNOF group at 12 months (+84%, $p < 0.05$) (figure 5CB).

PNOF induced alterations in the expression of genes involved in cardioprotection

Concerning the cardioprotective RISK pathway, at 4 months, we observed a 58% decrease of PI3K gene expression ($p < 0.05$), -30% for Akt ($p < 0.001$), -32% for ERK1 ($p < 0.001$), -40% for eNOS ($p < 0.01$) and a trend to decrease for GSK3- β ($p = 0.114$) and, in hearts of 6-months-old PNOF mice, a 23% decrease in Akt gene expression ($p < 0.05$) and a 35% decrease in ERK1

expression ($p < 0.01$). At 12 months, we observed a 44 % decrease of Akt gene expression ($p < 0.05$) and -51% for ERK1 ($p < 0.01$), -25% for eNOS ($p < 0.01$) in PNOF hearts compared to NF. We also observed a 75% increase of PI3K and GSK3- β gene expression between 4 and 12 months in PNOF mice's hearts. Concerning SAFE pathways, the gene expression of STAT3 was reduced by 30% in 4 ($p < 0.001$) and 6 months- ($p < 0.01$) old PNOF mice hearts and by 69% at 12 months (figure 6).

PNOF moderately increased circulating markers of inflammation

After cardiac ischemia reperfusion, the plasma concentration of activin A was similar in our two study groups at all ages, even if there was a tendency to increase in PNOF at 4 months as compared to NF mice ($p = 0.067$, table 3). Plasma concentration of activin A changed over time in PNOF, and, at 12 months, it was significantly lower than at 4 months, with a decrease of 70%, (234.4 ± 52.56 pg/mL vs, 70.39 ± 13.92 pg/mL, $p < 0.05$).

Blood concentrations of TNF- α and IL-1 β were undetectable in our samples. Blood concentration of IL-6 trend to increase in the PNOF mice at 4 months, and this increase became significant at 6 months ($p < 0.05$) compared to NF group after cardiac IR.

Finally, we observed no difference in our groups for GDF-15 plasma concentration after the *in vivo* myocardial surgery (table 3).

Discussion

Postnatal overfeeding (PNOF) is a well-established model for studying perinatally-programmed overweight and other pathophysiological disturbances [8]. Considering that two days after birth pups were mixed and randomly distributed among mothers in small or large litters, the differences observed might not be attributed to genetic differences due to distinct ancestors.

Our study provides new and original data concerning a permanent programming effect of PNOF on the cardiovascular and metabolism system of mature to very old mice. The alteration induced by PNOF from the weaning still impacts the cardiometabolic system until 18 months of life in mice.

PNOF mice developed an early overweight observable from weaning at 24 days of life which persisted throughout growth, maturation and even senescence (until 18 months of age) [12, 17-19]. These results are consistent with those already found by our team and others [17] which observed an increase in food intake of nearly 15-20% per day and a rise of body fat mass at the expense of lean mass [11]. The increase of food intake has been related to changes in hypothalamic expression of orexigenic and anorexigenic neuropeptides [20]. Other experimental studies demonstrated that, at weaning, PNOF mice [21] and rats [22, 23] presented visceral and subcutaneous fat accumulation with increased adipocyte surface [13, 24, 25], whereas in adult PNOF mice only an increase in visceral fat was present, a situation which is in favour of a “central adiposity concept”.

We founded that cardiac contractile function was also decreased by PNOF in young (4 months) adult (6 months), mature (12 months) and for the first time, in very old (18 months) mice with a nearly 10% reduction in LVEF. Therefore, this decrease in LV contractility is mild, and should not be considered as relevant for heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). Our results also suggest that only the systolic not the diastolic function was impacted by PNOF. Additionally, we did not observe any cardiac hypertrophy evaluated either through heart to body mass or to heart mass to tibial length. On the contrary, other authors found that PNOF induced cardiac hypertrophy in mice or in rats [11, 26-28], but these differences could be explained by the echocardiographic method of measurement. Interestingly, we noticed that the modification of cardiac function appeared between 2 and 4 months of age, suggesting that before 2 months, the heart of PNOF mice was able to adapt its function to maintain normal

LVEF, despite the early changes induced in the myocardium by PNOF. In fact, previous studies from our team have shown early modification of cardiac gene expression impacting isoforms of actin, myosin, collagen and other structural proteins [26]. Later on, other circulating or local environmental factors like myocardial oxidative stress or increased leptin blood levels might also play a role in a cardiac remodelling phenomenon [29-31].

PNOF leads to a greater sensitivity to in vivo myocardial ischemia, that may be observed not only in young mice but also up to 12 months after birth. These results corroborate previous data from our team, showing a higher sensitivity of isolated perfused hearts to ischemia in PNOF mice aged 7 months, showing lower functional parameters recovery and a higher infarct size after 30 min of global ischemia [26]. This increased heart sensitivity to both in vivo and ex vivo ischemia reperfusion could be explained in part by the alterations of cardioprotective pathways, especially for SAFE, which may predispose the heart to a greater damage during ischemic processes. In fact, in left ventricles of non-ischemic hearts from 4 -old PNOF mice, our original data show a decrease both in PI3K, Akt, eNOS and ERK1 (RISK pathway) [32] and in STAT3 (SAFE pathways [33]). At 12 months, the results for RISK pathways are not conclusive but the SAFE pathway is reduced by PNOF. The exact mechanism of this programming needs further exploration and may involve epigenetic processes such as gene methylation [34], histone modifications or interfering RNAs [35]. Additionally, this long-lasting increased vulnerability to ischemia could also involve other molecular pathways such as oxidative stress and inflammation.

It is admitted that an impairment of glucose or lipid metabolism has an impact on cardiovascular function [36, 37]. Indeed, in previous studies originating from our lab, we showed increased plasma levels of cholesterol, insulin and leptin, associated with glucose metabolism alterations in 6-months old PNOF mice [26]. Some of these criteria belong to the definition of metabolic syndrome and were also described in other studies [14, 38, 39]. In the present work, we performed an extensive study of glucose metabolism in young (4 months) to mature 12-months old male mice. We found that PNOF induced insulin resistance from the 6th month of life that persistent to 12 months, preceding a glucose intolerance that appeared only in old males' mice (12 months). This altered glycaemic status evolve over time since they are more severe with age and could explain altered cardiac function and higher sensitivity to

myocardial infarction [40]. In PNOF swiss mice, other research teams have found a diminution of phosphorylated Akt1 and PI3K-Irs1 [38], both involved in insulin signalling pathways, which may have a direct impact in the ischaemic heart. Moreover, it was shown that, from weaning [41] to adulthood [22], PNOF mice presented hyperglycaemia and hyperinsulinemia related to elevated GLUT2 content in pancreatic islets leading to increased insulin secretion [22]. Additionally, PNOF mice exhibit changes in peripheral insulin signalling, like downregulation of insulin receptor substrate-1 (Irs-1) and glucose transporter 4 (GLUT4) in white adipose tissue and skeletal muscle [42, 43], reducing glucose uptake and reinforcing the insulin resistance phenotype in these mice [44].

Interestingly, in this study, we observed that adult and old PNOF mice have increased pericardial fat mass, which displays a greater inflammatory status highlighted by an increase in gene expression of TNF- α and IL-6. In clinical studies, the volumes of epicardial and pericardial adipose tissues (EAT and PAT) are correlated with obesity, metabolic syndrome, insulin resistance, leptin level and diabetes [45]. Our findings concerning PAT strengthen the similarity of our original experimental model to the characteristics of metabolic syndrome described in humans. It is well known that EAT has paracrine effect on the myocardium which might not be such documented for PAT. By both paracrine and endocrine effect, PAT could communicate with the myocardium and influence its inflammatory status and cardiac function. It was also speculated that activin A originating from the EAT would exert direct profibrotic effect in the myocardium inducing the expression of TGF- β 1 and β 2 in rat atria [1]. Histological studies from our team showed a higher collagen density in biopsies of adult PNOF mice ventricle, associated with a local oxidative stress [26]. However, in this study, activin A gene expression in PAT and its plasma concentration were not increased at any age in PNOF group; therefore, in our model the fibrosis status is probably not related to activin A but could rather be due to an oxidative status of ventricle, as we described earlier [26].

In conclusion, our results highlighted the programming effect of overnutrition during the immediate postnatal period on cardio-metabolic function in young, adult, mature and old male mice. From weaning, PNOF mice developed overweight that modified body composition in favor of visceral and pericardial fat mass, associated with alterations of systolic cardiac function, higher sensitivity to ischemia reperfusion injury induced in vivo and abnormal glucose metabolism. Therefore, this experimental model of PNOF can be considered as

original and significantly relevant to the main characteristics of metabolic syndrome as described in humans. Interestingly, all these modifications appear very soon in life, from 4 months of age and persist with time, up to 12 months of age. Intriguingly, only 21 days of PNOF are sufficient to modify permanently the long-term health and impact both the cardiac and the metabolic function. More studies are needed to explore the exact pathways involved in programming phenomenon, but it should be emphasized that adjusting litter size in rodent's group may be a necessary prerequisite in experimental procedures aimed at evaluating cardiometabolic function.

Author contributions

Study conception and design: CV, CG

Acquisition of data: ER, MJ

Analysis and interpretation of data: CV, CG, ER, NR, LR

Drafting of manuscript: ER, CV, CG

Acknowledgements

The authors gratefully thank Ivan Porcherot and Sandy Guner for technical assistance.

Author disclosure statement

All co-authors state that there are no conflicts of interest, including financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence this work.

Funding

This work was supported by grants from the French Ministry of Research, the Regional Council of Burgundy, the Association de Cardiologie de Bourgogne (ACB), the E2S doctoral school of Dijon, the Fondation de France, and the Fédération Française de Cardiologie

References

1. Venteclef, N., et al., *Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases*. Eur Heart J, 2015. **36**(13): p. 795-805a.
2. Gaborit, B., et al., *Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location*. Cardiovasc Res, 2015. **108**(1): p. 62-73.
3. Ye, Z., et al., *Obesity induced by neonatal overfeeding worsens airway hyperresponsiveness and inflammation*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47013.
4. Langley-Evans, S.C., *Developmental programming of health and disease*. Proc Nutr Soc, 2006. **65**(1): p. 97-105.
5. Carpinello, O.J., A.H. DeCherney, and M.J. Hill, *Developmental Origins of Health and Disease: The History of the Barker Hypothesis and Assisted Reproductive Technology*. Semin Reprod Med, 2018. **36**(3-04): p. 177-182.
6. Barker, D.J., *Developmental origins of adult health and disease*. J Epidemiol Community Health, 2004. **58**(2): p. 114-5.
7. Agoudemos, M., et al., *Programming of adult cardiovascular disease following exposure to late-gestation hyperglycemia*. Neonatology, 2011. **100**(2): p. 198-205.
8. Parra-Vargas, M., et al., *Size Does Matter: Litter Size Strongly Determines Adult Metabolism in Rodents*. Cell Metab, 2020. **32**(3): p. 334-340.
9. Josse, M., et al., *Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
10. Plagemann, A., et al., *Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding*. Exp Clin Endocrinol, 1992. **99**(3): p. 154-8.
11. Li, N., et al., *Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 30817.
12. Harder, T., et al., *Overweight and increased diabetes susceptibility in neonatally insulin-treated adult rats*. Endocr Regul, 1999. **33**(1): p. 25-31.
13. Boullu-Ciocca, S., et al., *Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 197-203.
14. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood*. Biochimie, 2012. **94**(1): p. 117-24.
15. Huet, F., et al., *Low-dose colchicine prevents sympathetic denervation after myocardial ischemia-reperfusion: a new potential protective mechanism*. Future Sci OA, 2020. **7**(2): p. FSO656.
16. Belaidi, E., et al., *Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia*. Int J Cardiol, 2016. **210**: p. 45-53.
17. Plagemann, A., *Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake*. Horm Res, 2006. **65 Suppl 3**: p. 83-9.
18. Heidel, E., A. Plagemann, and H. Davidowa, *Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats*. Neuroreport, 1999. **10**(9): p. 1827-31.
19. Plagemann, A., et al., *Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats*. Brain Res, 1999. **818**(1): p. 160-3.
20. Davidowa, H., Y. Li, and A. Plagemann, *Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(3): p. 613-21.

21. Glavas, M.M., et al., *Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet*. *Endocrinology*, 2010. **151**(4): p. 1598-610.
22. Cunha, A.C., et al., *Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2*. *J Nutr Biochem*, 2009. **20**(6): p. 435-42.
23. Munoz-Valverde, D., et al., *Effect of fetal undernutrition and postnatal overfeeding on rat adipose tissue and organ growth at early stages of postnatal development*. *Physiol Res*, 2015. **64**(4): p. 547-59.
24. Boullu-Ciocca, S., et al., *Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood*. *Diabetes*, 2008. **57**(3): p. 669-77.
25. Hou, M., et al., *Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e25726.
26. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56981.
27. Moreira, A.S., et al., *Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009. **19**(11): p. 805-10.
28. Junior, M.D.F., et al., *Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats*. *Life Sci*, 2019. **226**: p. 173-184.
29. Lopez, M., et al., *A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat*. *Diabetologia*, 2005. **48**(1): p. 140-8.
30. Velkoska, E., T.J. Cole, and M.J. Morris, *Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **288**(6): p. E1236-43.
31. Rodrigues, A.L., et al., *Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats*. *J Nutr Biochem*, 2011. **22**(2): p. 109-17.
32. Sivaraman, V., et al., *Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway*. *Basic Res Cardiol*, 2007. **102**(5): p. 453-9.
33. Kelly, R.F., et al., *Ethanolamine is a novel STAT-3 dependent cardioprotective agent*. *Basic Res Cardiol*, 2010. **105**(6): p. 763-70.
34. Plagemann, A., et al., *Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 20): p. 4963-76.
35. Siddeek, B., et al., *Transient postnatal over nutrition induces long-term alterations in cardiac NLRP3-inflammasome pathway*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2018. **28**(9): p. 944-951.
36. Kolterman, O.G., et al., *Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus*. *J Clin Invest*, 1981. **68**(4): p. 957-69.
37. Godfrey, K.M. and D.J. Barker, *Fetal nutrition and adult disease*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(5 Suppl): p. 1344S-52S.
38. Martins, M.R., et al., *Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice*. *J Endocrinol*, 2008. **198**(3): p. 591-8.
39. Souza, L.L., E.G. Moura, and P.C. Lisboa, *Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring*. *Nutrients*, 2022. **14**(10).
40. Shinlapawittayatorn, K., S.C. Chattipakorn, and N. Chattipakorn, *The Influence of Obese Insulin-Resistance on the Outcome of the Ischemia/Reperfusion Insult to the Heart*. *Curr Med Chem*, 2018. **25**(13): p. 1501-1509.
41. Du, Q., et al., *Postnatal weight gain induced by overfeeding pups and maternal high-fat diet during the lactation period modulates glucose metabolism and the production of pancreatic and gastrointestinal peptides*. *Peptides*, 2015. **70**: p. 23-31.

42. Liu, H.W., et al., *Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(11): p. 1859-69.
43. Bei, F., et al., *Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats*. Lipids Health Dis, 2015. **14**: p. 96.
44. Rodrigues, A.L., et al., *Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition*. J Endocrinol, 2007. **195**(3): p. 485-94.
45. Lazaros, G., et al., *The Role of Epicardial Fat in Pericardial Diseases*. Curr Cardiol Rep, 2018. **20**(6): p. 40.
46. Parra-Vargas, M., et al., *The long-lasting shadow of litter size in rodents: litter size is an underreported variable that strongly determines adult physiology*. Mol Metab, 2023. **71**: p. 101707.

Tables

Table 1: Forward and reverse sequences of primers used for the amplification of mouse genes

Primer name	Sense primer sequence	Antisense primer sequence
Actin β	5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3'	5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3'
Activin A	5'-GGGGAGAACGGGTATGTGGA-3'	5'-CCTGACTCGGCAAAGGTGAT-3'
IL-6	5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3'	5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'
TNF α	5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3'	5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG-3'
STAT3	5'-CTTCAGACCCGCCAACA-3'	5'-TAGGACACTTTCTGCTGC-3'
Akt	5'-CCACGCTACTTCCTCCTC-3'	5'-CATCCTGAGGCCGTTCC-3'
ERK1	5'-GGTAGACCGTTCTGGAATG-3'	5'-GCAGAGCCCTACTCAGTG-3'
GSK3-β	5'-TGTTCTATGTGACTTGGTTTG-3'	5'-CAGAGTGGGAAGGGTGAA-3'
PI3K	5'-TTGTGGCGTCATAGATTGTGG-3'	5'-GTAACCTACCTAGCCCTTTGTGC-3'

Table 2: Echocardiographic parameters from postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4, 6 and 12 months of age. Acquisition were made using the VEVO 770 imaging system (Visualsonics) with a 30 MHz probe. LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction; LVIDd: Left Ventricular Internal Diameters diastolic; E: early diastolic transmitral flow velocities; A: late diastolic transmitral flow velocities; e': peak early-diastolic annular velocities. P was calculated by One-way ANOVA test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.001$: significantly different from NF group.

	4 months		6 months		12 months		18 months	
	NF Mean \pm SEM	PNOF Mean \pm SEM						
Body weight (g)	30.34 \pm 0.19	34.71 \pm 0.30****	33.00 \pm 0.28	38.59 \pm 0.47****	38.50 \pm 0.70	46.66 \pm 0.90****	37.10 \pm 1.20	40.94 \pm 0.99*
LVEF (%)	64.63 \pm 1.30	57.25 \pm 0.84**	64.38 \pm 1.58	58.38 \pm 1.27**	67.10 \pm 1.15	61.39 \pm 1.24*	65.20 \pm 0.73	58.00 \pm 1.51*
LVIDd (mm)	3.91 \pm 0.67	4.11 \pm 0,05	4.16 \pm 0.12	4.26 \pm 0.15	4.12 \pm 0.10	4.21 \pm 0.13	4.18 \pm 0.12	4.40 \pm 0.12
Heart rate (beats/min)	431.6 \pm 11.8	445.0 \pm 13.7	491.8 \pm 25.7	479.8 \pm 19.8	472.0 \pm 11.9	507.3 \pm 9.1	442.4 \pm 16.3	460.4 \pm 10.9
E/A	1.41 \pm 0.04	1.34 \pm 0,05	1.57 \pm 0.07	1.48 \pm 0,05	1.61 \pm 0.04	1.49 \pm 0.07	1.52 \pm 0.09	1.39 \pm 0.06
E/e'	36.92 \pm 2.50	34.96 \pm 1.34	25.69 \pm 1.67	21.53 \pm 1.73	27.07 \pm 2.93	31.79 \pm 3.29	21.40 \pm 2.48	27.45 \pm 4.05
LV mass/Body weight	4.31 \pm 0.11	4.53 \pm 0.11	4.20 \pm 0.23	3.99 \pm 0.25	3.50 \pm 0.26	3.55 \pm 0.24	3.98 \pm 0.46	3.86 \pm 0.15

Table 3: Circulating plasma concentration of Activin A, IL-6 and GDF-15 in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice, 24 hours after *in vivo* myocardial ischemia reperfusion. Results are obtained in thawed mice plasma. The amount of TNF- α and IL-1 β were undetectable (not shown). P was calculated by One -way ANOVA test, *: p<0.05: significantly different from NF group; #: p<0.05, 12 months different to 4 months in the same group.

	4 months		6 months		12 months	
	NF Mean \pm SEM	PNOF Mean \pm SEM	NF Mean \pm SEM	PNOF Mean \pm SEM	NF Mean \pm SEM	PNOF Mean \pm SEM
Activin A (pg/mL)	102.20 \pm 30.69	234.40 \pm 52.56	120.20 \pm 43.75	93.84 \pm 31.09	77.05 \pm 14.75	70.39 \pm 13.92 [#]
IL-6 (pg/mL)	106.50 \pm 41.12	293.60 \pm 130.60	16.04 \pm 3.60	163.10 \pm 55.32 [*]	55.37 \pm 26.98	91.22 \pm 60.50
GDF-15 (pg/mL)	181.90 \pm 15.79	217.00 \pm 61.85	188.40 \pm 25.74	285.40 \pm 56.48	260.00 \pm 43.62	389.70 \pm 29.14

Figures

Figure 1: Evolution of body weight in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice from 24 days up to 18 months of age. Results are expressed as medians \pm min to max values, P was calculated by One-way-ANOVA: *: $p < 0.05$ was considered significantly different, ***: $p < 0.001$.

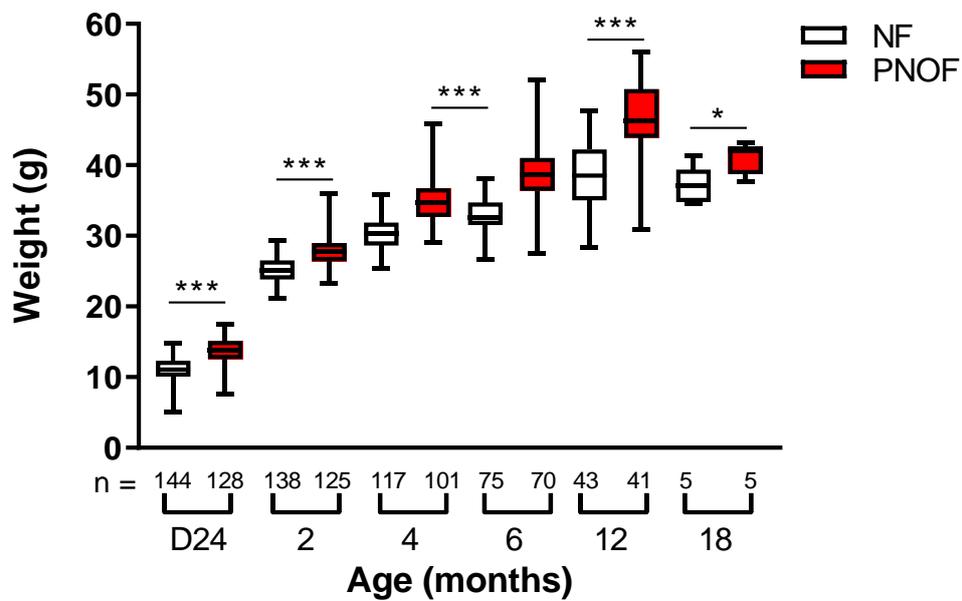


Figure 2: Left Ventricular Ejection Fraction (LVEF, %) in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice from 2 to 18 months of age. The numbers (n) are listed by age for the two groups, LVEF was calculated by measuring the left ventricular internal diameter in the end diastolic and end systolic by echocardiography (VEVO 770, Visualsonics). Data are expressed as medians \pm min to max values. P was calculated by one-way ANOVA, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

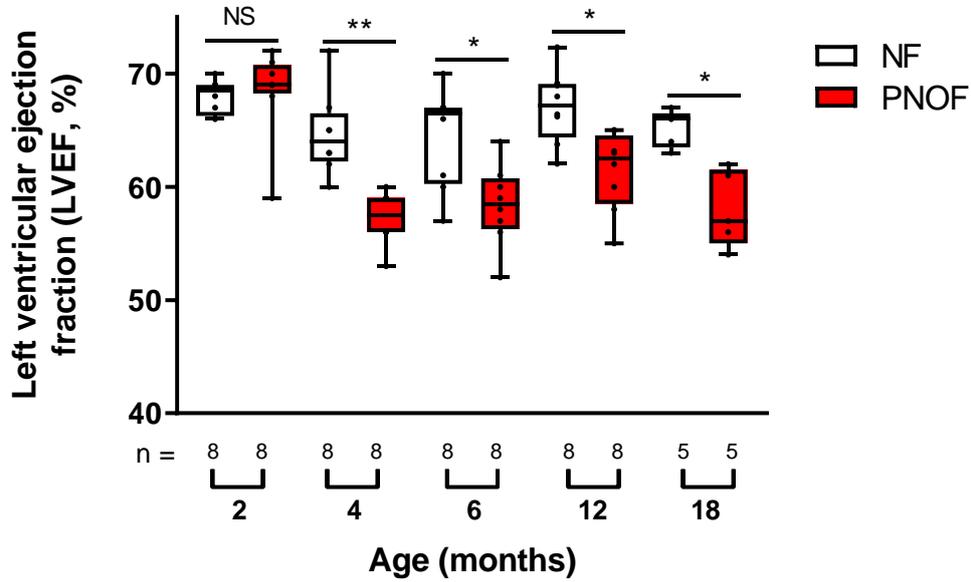


Figure 3: Quantification of area at risk (AAR, A) and infarct size (IS, B) in hearts of postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4 to 12 months of age after *in vivo* ischemia (45 min) induced by ligation of LAD coronary artery followed by 24 h of reperfusion. The AAR was quantified by Evan's blue coloration and the IS using TriphenylTetrazolium Chloride staining. The images were treated using image J software. Data are expressed as medians \pm min to max values, P was calculated by Student's t-test, within the same age, *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$.

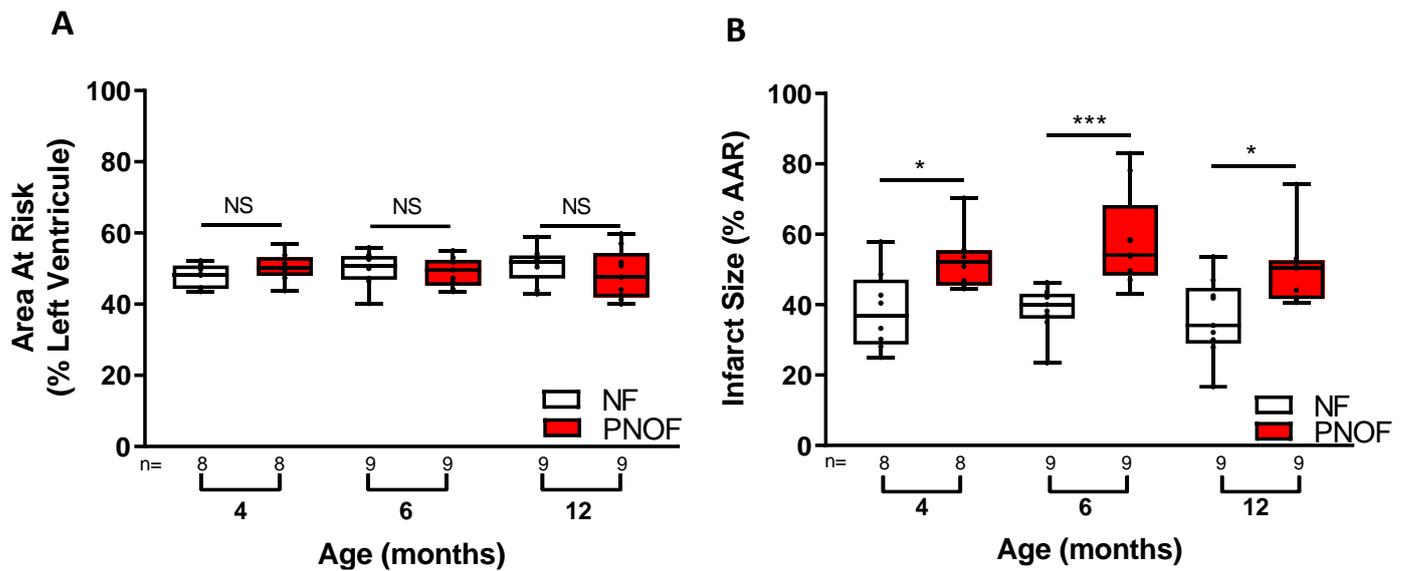


Figure 4: Evaluation of glucose metabolism in postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 2 to 12 months of age. Evolution of blood glucose (A, C) and area under the curve of blood glucose (B, D) after intraperitoneal glucose (A, B) or insulin injection (C, D) in NF and PNOF mice (8 mice/group). Area under curve were calculated by adding area at each timepoint. Data are expressed as means \pm SEM, P was calculated by Mann-Whitney test, within the same age, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

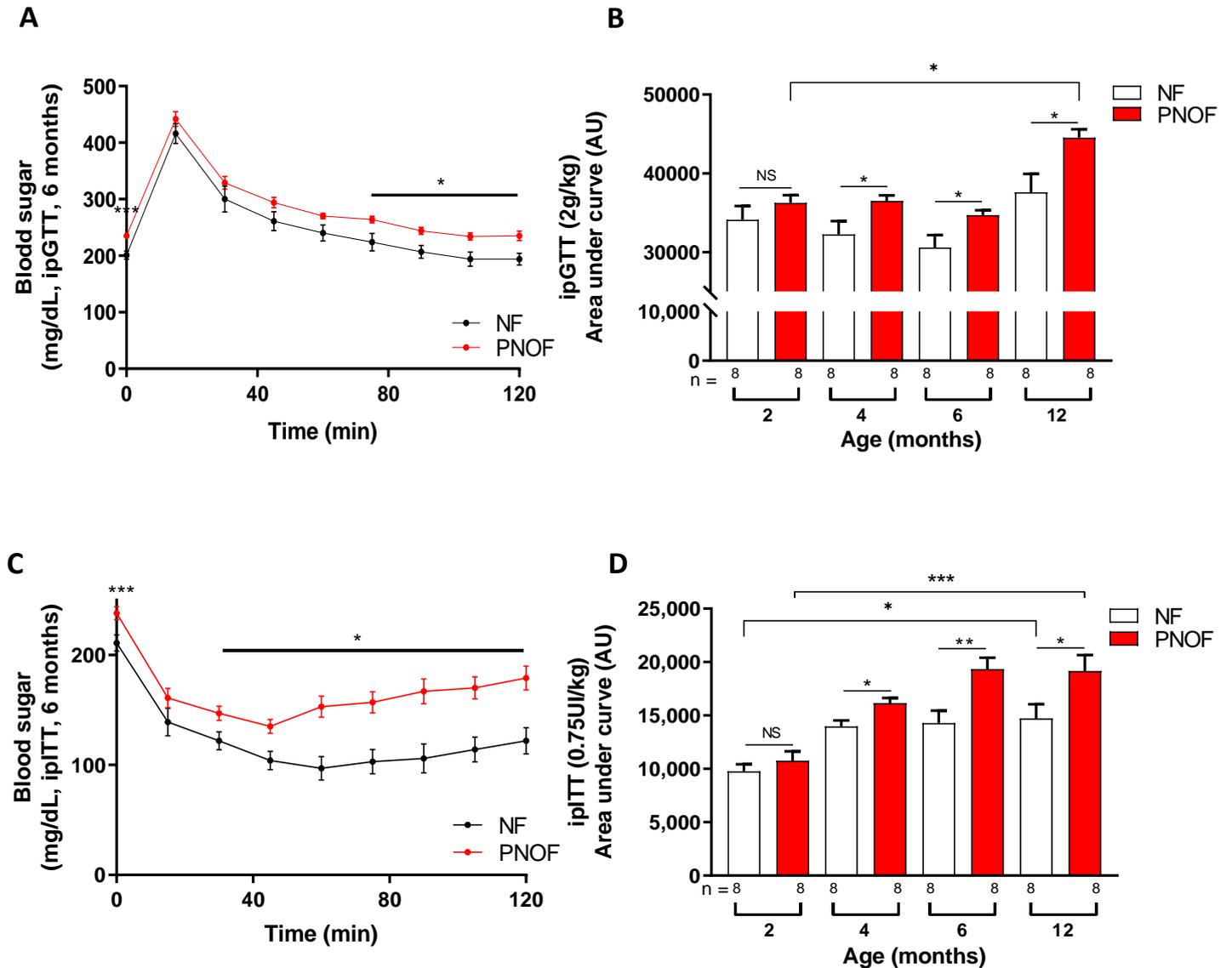


Figure 5: Mass of the pericardial fat and (A) quantitative rt-qPCR analysis for activin A (B), IL-6 (C) and TNF- α (D) in pericardial adipose tissue (PAT) of postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4 to 12 months of age. The pericardial adipose tissue mass was weighted after tissue harvesting. RNAs were extracted from PAT after harvesting. Data are expressed as the fold change relative to the beta actin gene expression. Data are expressed as means \pm SEM, P was calculated by student's t-test: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

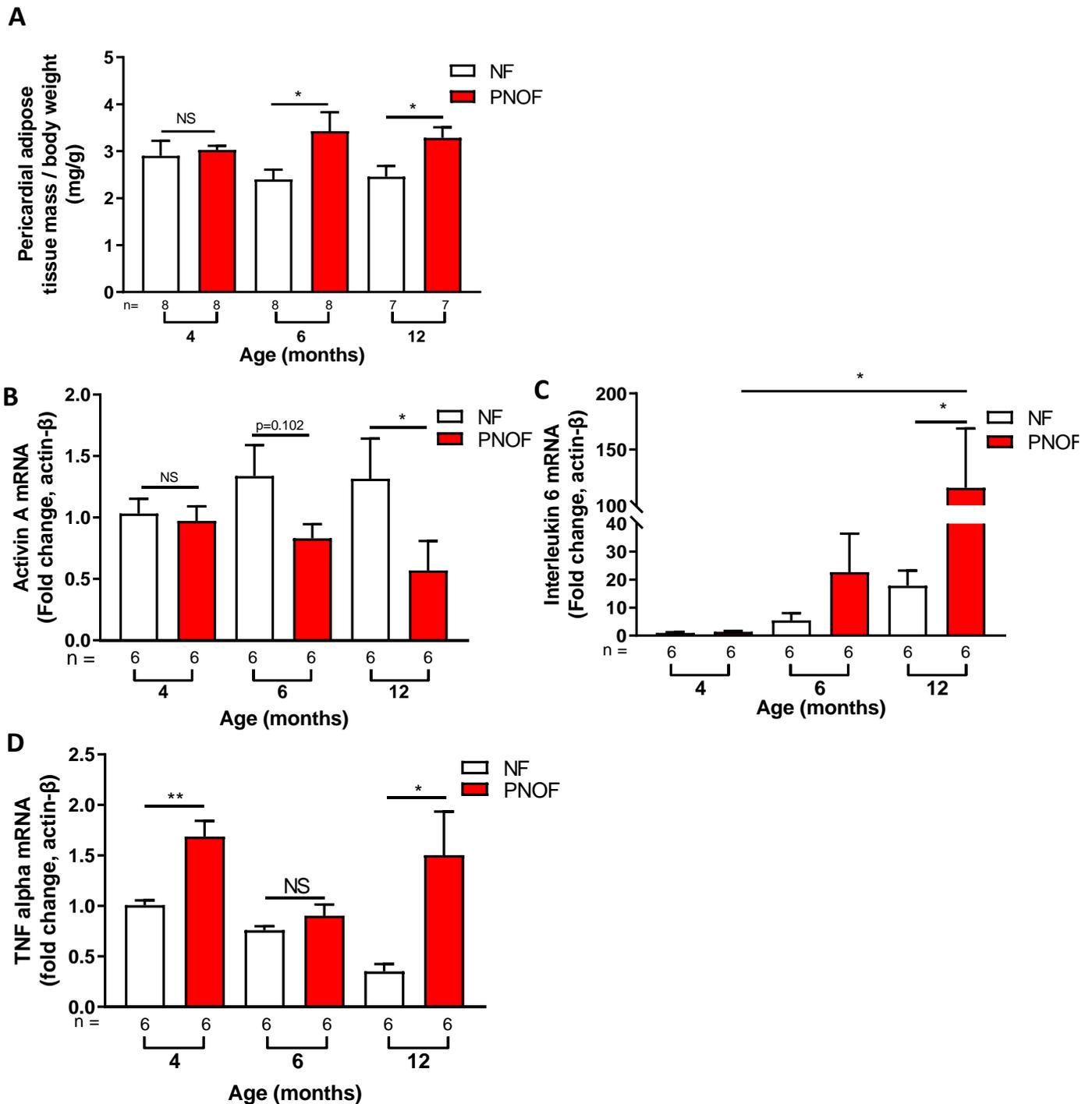
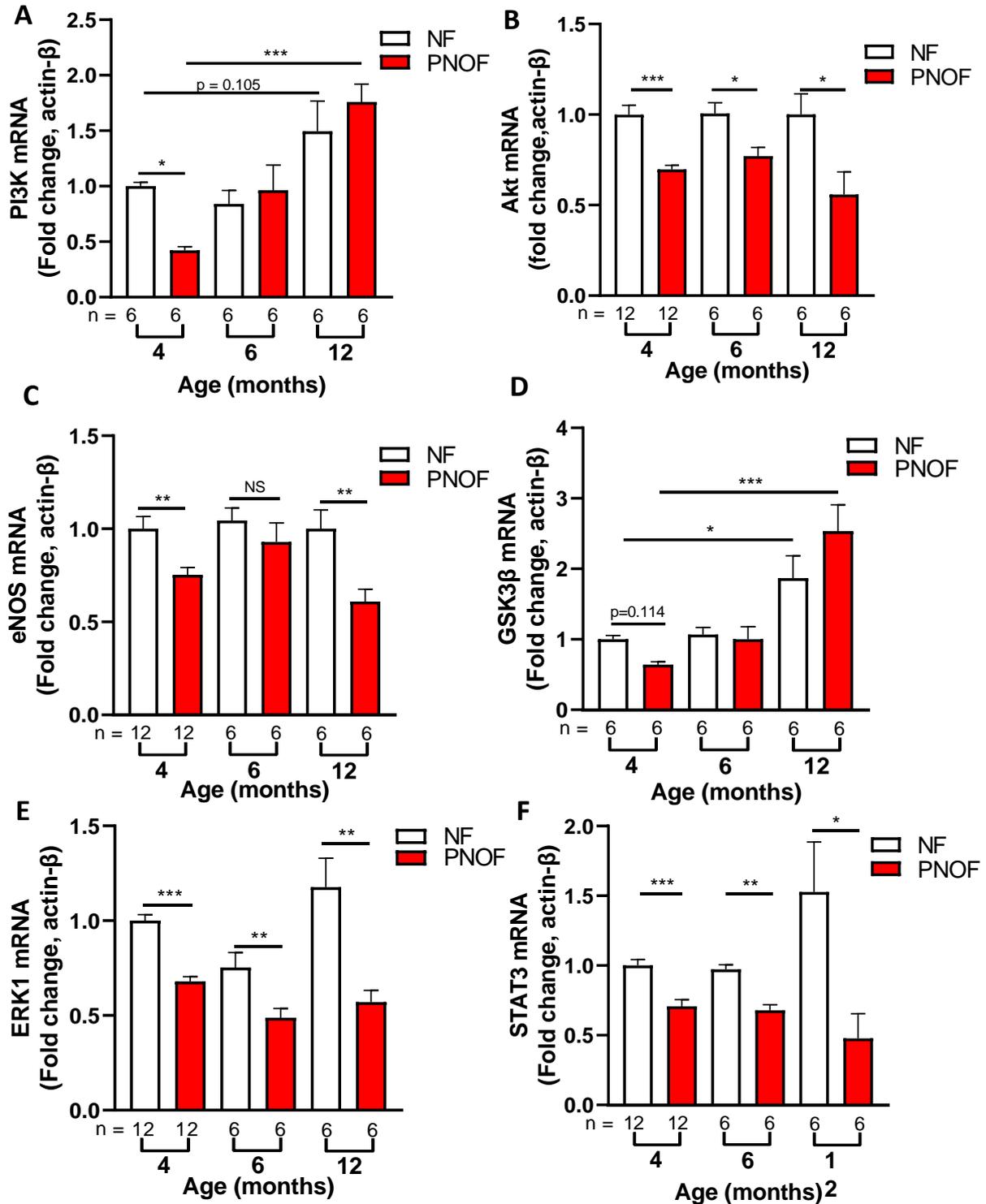


Figure 6: Quantitative rt-PCR analysis for PI3K (A), Akt (B), eNOS (C), GSK3- β (D), ERK1 (E) and STAT3 (F) in left ventricle of postnatally normally-fed (NF) and overfed (PNOF) mice of 4, 6 and 12 months of age. RNAs were extracted from total left ventricle after harvesting. Data are expressed as the fold change relative to the beta actin gene expression and represent the mean \pm SEM. P was calculated by one-way ANOVA test: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$



Conclusion

En conclusion, nos résultats ont mis en évidence l'effet de « programmation » d'une surnutrition pendant la période postnatale immédiate sur la fonction cardiométabolique de souris mâles de différents âges : jeunes, adultes, matures et âgées. Dès le sevrage, les souris SAPN ont développé un surpoids qui a modifié la composition corporelle en faveur de la masse grasse viscérale et péricardique, associée à des altérations de la fonction cardiaque systolique, une sensibilité plus élevée aux lésions d'ischémie-reperfusion induites *in vivo* et un métabolisme anormal du glucose. Par conséquent, ce modèle expérimental de SAPN peut être considéré comme original et significativement pertinent par rapport aux principales caractéristiques du syndrome métabolique tel que décrit chez l'Homme. Il est intéressant de noter que toutes ces modifications apparaissent très tôt, dès l'âge de 4 mois et persistent dans le temps, jusqu'à l'âge de 12 mois. Curieusement, seulement 21 jours de SAPN ont un impact suffisant pour modifier de façon permanente la fonction cardiaque et la fonction métabolique des souris. D'autres études seront nécessaires pour explorer les voies cellulaires et moléculaires exactes impliquées dans ce phénomène de programmation, mais il convient de souligner que l'ajustement de la taille des portées après la naissance chez les rongeurs doit être une condition préalable nécessaire aux procédures expérimentales visant à évaluer la fonction cardio-métabolique.

Article 2 : Dimorphisme sexuel dans l'impact cardio-métabolique de la suralimentation postnatale chez les souris

I/ Introduction

Bien que les facteurs de risque traditionnels de maladies cardiovasculaires (MCV) soient identiques chez les femmes et les hommes, les différences de prévalence et d'impact de ces facteurs de risque varient entre les sexes. Or, les recommandations de prise en charge hospitalière des patients des deux sexes sont basées sur des données issues d'essais expérimentaux et cliniques surreprésentant la population masculine. Par exemple, les études cliniques en cardiologie n'intègrent que 30% de sujets féminins [254], alors qu'en Europe les taux de mortalité liés aux MCV touchent 51% des décès pour les femmes, contre 42% pour les hommes [255]. De même, des études épidémiologiques ont montré que les femmes constituaient la majorité des patients atteints d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (HFpEF) [256, 257] soulignant les susceptibilités aux MCV différentes de la population féminine comparé à la population masculine. Afin de comprendre ces différences d'impacts des MCV entre hommes et femmes, des études cliniques se sont intéressées aux caractéristiques du système cardiovasculaire de patients des deux sexes et ont montré de nombreuses différences anatomiques et fonctionnelles cardiaques. En effet, après indexation sur la taille et/ou la surface corporelle, les femmes ont des ventricules (VG et VD) plus petits avec des parois ventriculaires plus minces. La capacité fonctionnelle cardiaque des femmes est plus faible que celle des hommes, avec une réduction des volumes télédiastoliques et télésystoliques du VG et des volumes d'éjection ventriculaires (VG et VD) plus faibles. Les femmes ont un débit cardiaque plus faible et une fréquence cardiaque plus importante que celle des hommes, mais leur surface corporelle plus réduite permet de maintenir un index cardiaque similaire à celui de l'homme [258]. Au niveau vasculaire, après ajustement sur l'âge, le poids, l'IMC et la surface corporelle, des mesures échographiques et angiographiques ont permis de mettre en évidence des diamètres fémoraux et coronaires globalement plus petits chez la femme, indépendamment de la masse du VG [259]. Enfin, chez l'humain, la pression artérielle est évolutive avec l'âge : elle est plus faible chez les femmes en début de vie, mais la PA des femmes devient supérieure à celle des hommes avec l'âge.

Certaines de ces inégalités de santé seraient programmées dès les premiers stades de développement, avec des différences de croissance et de sensibilité face aux facteurs environnementaux [260]. Les femmes seraient plus sensibles aux désordres nutritionnels

présents chez leur mère (sous- ou sur-nutrition, diabète gestationnel) [261, 262] et en conséquence, leur PC serait plus facilement altéré que celui des hommes [263, 264]. Les femmes présenteraient également un pourcentage d'adiposité plus important [265] et une dérégulation du métabolisme des lipides, de l'insuline [261, 266, 267] ainsi que des glucides [264, 268] plus prononcée que les hommes.

Dans cette deuxième partie, nous avons choisi d'étudier le dimorphisme sexuel dans notre modèle de SAPN en intégrant des souris femelles dans nos expérimentations. Compte tenu des résultats obtenus sur les souris mâles SAPN (partie 1 des résultats), nous avons répété une partie de nos expérimentations sur des femelles âgées de 2 à 18 mois.

II/ Résultats

1/ Évolution du poids corporel

Les études ont été réalisées sur plusieurs séries d'animaux afin d'obtenir les effectifs nécessaires pour toutes les expérimentations. La figure suivante montre l'évolution du PC des souris sur l'ensemble des séries utilisées. Le PC des animaux mâles et femelles a été suivi de façon mensuelle dès le sevrage (24^{ème} jour de vie) et jusqu'au 18^{ème} mois de vie.

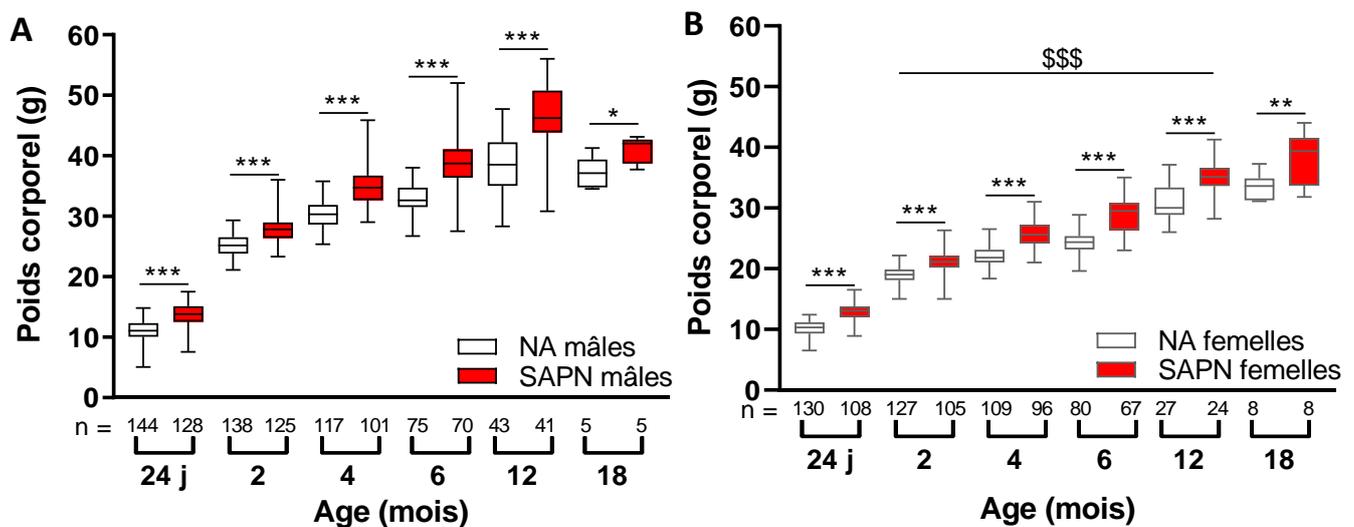


Figure 1 : Évolution du poids corporel des souris mâles (A) et femelles (B) des groupes normo alimentés (NA, blanc) et suralimentés (SAPN, rouge) après la naissance, âgés de 24 jours à 18 mois. Les graphiques représentent les médianes ± valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$. Significativement différent au sein d'un groupe du même âge mais de sexe opposé : \$ $p < 0,05$; \$\$: $p < 0,01$; \$\$\$: $p < 0,001$.

La SAPN induit une augmentation significative du PC des animaux de façon précoce et persistante quel que soit le sexe des animaux. Au sevrage, l'augmentation du PC était de 20% pour les animaux SAPN des deux sexes par rapport à leur groupe contrôle (respectivement $13,82 \pm 0,18$ g vs, $11,08 \pm 0,15$ g, $p < 0,001$, et $12,75 \pm 0,16$ g vs $10,19 \pm 0,11$ g, $p < 0,001$). Pour les animaux juvéniles (2 mois de vie), l'augmentation du PC était de 10% pour les mâles et 11% pour les femelles par rapport aux animaux NA du même sexe (respectivement $27,84 \pm 0,19$ g, vs $25,16 \pm 0,15$ g, $p < 0,001$ et $21,17 \pm 0,15$ g vs $18,98 \pm 0,11$ g, $p < 0,001$). A 4 mois la SAPN induit une hausse de PC de 13% pour les mâles et de 14% pour les femelles par rapport aux

NA ($34,71 \pm 0,29$ g vs $30,14 \pm 0,19$ g, $p < 0,001$ et $25,75 \pm 0,21$ g vs $22,05 \pm 0,15$ g, $p < 0,001$). A l'âge adulte (6 mois), le PC des animaux SAPN par rapport aux NA était significativement supérieur de 17% pour les mâles et de 15% pour les femelles (respectivement $38,59 \pm 0,47$ g vs $33,00 \pm 0,28$ g, $p < 0,001$ et $28,99 \pm 0,36$ g vs $24,52 \pm 0,21$ g, $p < 0,001$). Les souris d'âge mûr (12 mois) présentaient un PC plus important de 17% pour les mâles et de 13% pour les femelles (respectivement $46,66 \pm 0,90$ g vs $38,50 \pm 0,70$ g, $p < 0,001$ et $35,31 \pm 0,59$ g vs $30,66 \pm 0,52$ g, $p < 0,001$). Enfin, l'augmentation du PC des animaux très âgées était de 9% pour les mâles et de 15% pour les femelles ($40,94 \pm 0,99$ g vs, $37,1 \pm 1,20$ g, $p < 0,05$ et $38,39 \pm 1,53$ g vs $33,51 \pm 0,76$ g, $p < 0,01$)

Le sexe des animaux n'impacte pas les effets de la SAPN sur l'évolution du PC par rapport aux animaux témoins. Cependant, le PC des mâles devient significativement supérieur ($p < 0,001$) à celui des femelles au même âge et pour un groupe identique à partir de 2 mois de vie et jusqu'à 12 mois. A 18 mois, les PC des animaux mâles et femelles étaient similaires.

2/ Graisse péricardique

Le tissu adipeux péricardique a été prélevé à l'issue des chirurgies cardiaques. Il a été pesé et congelé rapidement dans l'azote liquide pour des expérimentations ultérieures. La masse du tissu adipeux péricardique (TAP) a été ajustée au PC des animaux.

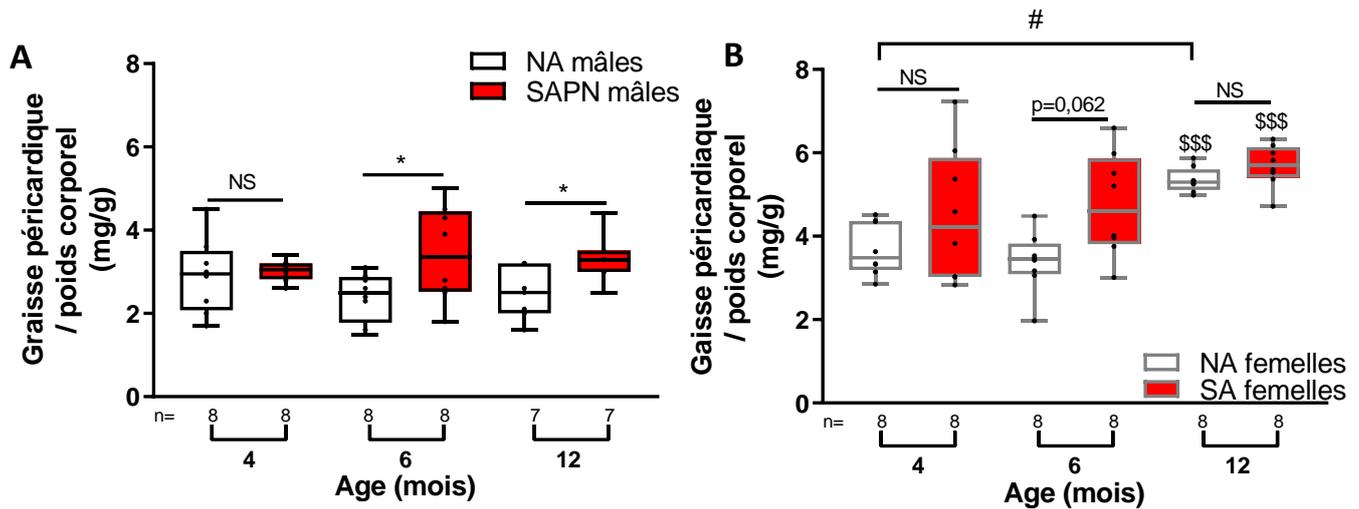


Figure 2 : Masse du tissu adipeux rapportée au poids corporel des animaux NA et SAPN, mâles (A) et femelles (B). Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe * : $p < 0,05$. Significativement différent au sein d'un même groupe mais d'âge différent : # : $p < 0,05$. Significativement différent au sein d'un groupe du même âge mais de sexe opposé : \$\$\$: $p < 0,001$.

La SAPN induit une augmentation du rapport de la masse du TAP ajustée au PC des animaux mâles âgés de 6 et 12 mois (+41%, $p < 0,05$) par rapport au groupe NA, mais n'induit pas de différence chez les femelles. Néanmoins, avec l'âge, la masse du TAP s'accroît significativement chez les femelles du groupe NA (4 mois vs 12 mois +31%, $p < 0,05$). Ces résultats suggèrent que la quantité de TAP augmente avec l'âge uniquement chez les femelles.

Enfin le sexe des animaux impacte la masse du TAP car les femelles NA et SA de 12 mois présentent un rapport TAP/PC significativement supérieur à celui des mâles du même groupe et âge.

3/ Suivi de la fonction cardiaque

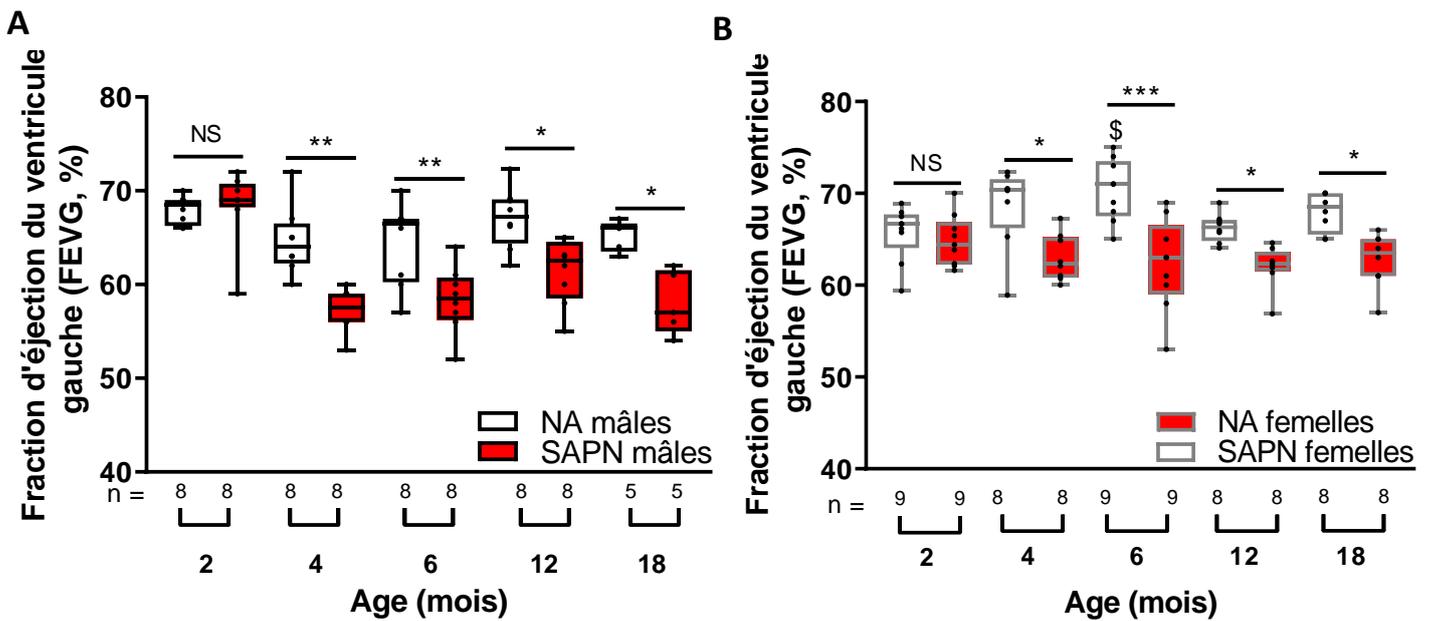


Figure 3 : Évolution de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) des animaux NA et SAPN, mâles (A) et femelles (B). Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $p < 0,001$. Significativement différent au sein d'un groupe du même âge mais de sexe opposé : \$: $p < 0,05$.

Une altération précoce et persistante de la fonction contractile du ventricule gauche a été observée chez les souris ayant été soumises à une SAPN indépendamment du sexe, dès 4 mois (-9% pour les mâles, $p < 0,01$; -8% pour les femelles, $p < 0,05$) et jusqu'à 18 mois avec une diminution moyenne de la FEVG de 11% chez les mâles et de 9% chez les femelles.

L'évolution de la FEVG au cours du temps était similaire pour les animaux des deux sexes ; cependant la FEVG des mâles du groupe NA de 6 mois était significativement plus faible que celle des femelles.

L'analyse des autres paramètres cardiaques n'indique pas d'anomalie de la relaxation cardiaque chez les animaux SAPN mâles, avec des diamètres internes du ventricule gauche (LVIDd) ainsi que des rapports impliquant les ondes E, A et e' similaires. De même, le rapport de la masse ventriculaire gauche sur le PC des animaux ne montre pas d'hypertrophie cardiaque chez les mâles, peu importe leur âge. En revanche, la SAPN induit une dilatation du VG précoce et transitoire chez les femelles par rapport aux groupes NA, avec une

augmentation des diamètres internes du VG en fin de diastole à 4mois (+6%, $p<0,05$) et à 6 mois (+8%, $p<0,01$), sans modifications des rapports impliquants les ondes E, A et e'.

En outre, les diamètres internes du VG des animaux mâles des deux groupes sont plus importants que ceux des femelles, sans être associés à une variation des rapports du poids du VG par le PC. Ces résultats sous-entendent que le cœur des mâles est plus gros que le cœur des femelles en valeur absolue, mais rapporté au PC ces différences s'effacent. Par conséquent le sexe n'a pas d'impact sur la fonction cardiaque des souris SAPN âgées de 2 à 18 mois.

Tableau 1 : Caractéristiques échocardiographiques des animaux mâles (A) et femelles (B) aux différents âges. VG : ventricule gauche ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche ; LVIDd : diamètre interne du ventricule gauche en fin de diastole ; Onde E : onde protodiastolique, représentant le remplissage passif du ventricule ; Onde A : contraction auriculaire permettant le remplissage ventriculaire actif ; Rapport E/A : rapport entre les vitesses maximales des ondes E et A (indice de remplissage ventriculaire) ; Onde e' : caractérise la vitesse de déplacement du muscle cardiaque au niveau de la paroi latérale de la valve mitrale. E/e' : indice de vélocité tissulaire (indice de pression de remplissage du VG). Les données sont exprimées avec la moyenne \pm ESM. Significativement différent du groupe témoin du même âge et du même sexe : * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$. Significativement différent du même groupe et du sexe opposé : \$: $p < 0,05$; \$\$: $p < 0,01$; \$\$\$: $p < 0,001$

A	Mâles	4 mois		6 mois		12 mois		18 mois	
		NA Moyennes \pm ESM	SAPN Moyennes \pm ESM						
	FEVG (%)	64,63 \pm 1,30	57,25 \pm 0,84**	64,38 \pm 1,42	58,38 \pm 1,27**	67,10 \pm 1,15	61,39 \pm 1,16*	65,20 \pm 0,73	58,00 \pm 1,51*
	LVIDd (mm)	3,91 \pm 0,67	4,11 \pm 0,05	4,16 \pm 0,12	4,26 \pm 0,15	4,12 \pm 0,10	4,21 \pm 0,13	4,18 \pm 0,12	4,40 \pm 0,12
	Fréquence cardiaque (batt/min)	431,6 \pm 11,8	445,0 \pm 13,7	491,8 \pm 25,7	479,8 \pm 19,8	472,0 \pm 11,9	507,3 \pm 9,1	442,4 \pm 16,3	460,4 \pm 10,9
	E/A	1,41 \pm 0,04	1,34 \pm 0,05	1,57 \pm 0,07	1,48 \pm 0,05	1,61 \pm 0,04	1,49 \pm 0,07	1,52 \pm 0,09	1,39 \pm 0,06
	E/e'	36,92 \pm 2,50	34,96 \pm 1,34	25,69 \pm 1,67	21,53 \pm 1,73	27,07 \pm 2,93	31,79 \pm 3,29	21,40 \pm 2,48	27,45 \pm 4,05
	Poids VG/poids corporel	4,31 \pm 0,11	4,53 \pm 0,11	4,20 \pm 0,23	3,99 \pm 0,25	3,50 \pm 0,26	3,55 \pm 0,24	3,98 \pm 0,46	3,86 \pm 0,15

B	Femelles	4 mois		6 mois		12 mois		18 mois	
		NA Moyennes \pm ESM	SAPN Moyennes \pm ESM						
	FEVG (%)	68,60 \pm 1,58	62,99 \pm 0,91*	70,33 \pm 1,12	62,22 \pm 1,66***	66,48 \pm 0,56	62,01 \pm 0,82*	68,00 \pm 0,75	62,88 \pm 1,09*
	LVIDd (mm)	3,37 \pm 0,05\$	3,60 \pm 0,05*	3,46 \pm 0,05\$\$\$	3,76 \pm 0,05**,\$\$	3,38 \pm 0,10\$\$	3,78 \pm 0,05\$	3,59 \pm 0,09\$\$	3,69 \pm 0,06\$\$\$
	Fréquence cardiaque (batt/min)	474,0 \pm 27,80	527,0 \pm 21,98	491,3 \pm 21,49	466,4 \pm 18,16	570,0 \pm 27,60	493,0 \pm 42,63	493,0 \pm 14,07	511,0 \pm 12,03
	E/A	1,54 \pm 0,03	1,55 \pm 0,03	1,53 \pm 0,04	1,46 \pm 0,04	1,54 \pm 0,03	1,50 \pm 0,03	1,47 \pm 0,04	1,43 \pm 0,02
	E/e'	28,94 \pm 2,56	30,62 \pm 0,74	20,44 \pm 2,07	25,67 \pm 1,78	28,53 \pm 1,47	27,69 \pm 1,15	29,89 \pm 1,81	27,42 \pm 1,22
	Poids VG/poids corporel (mg/g)	4,86 \pm 0,22	4,34 \pm 0,23	4,26 \pm 0,18	3,80 \pm 0,13	3,64 \pm 0,14	3,34 \pm 0,10	3,49 \pm 0,27	3,23 \pm 0,20

4/ Sensibilité du cœur aux lésions d'ischémie reperfusion *in vivo*

(a) Aires à risque

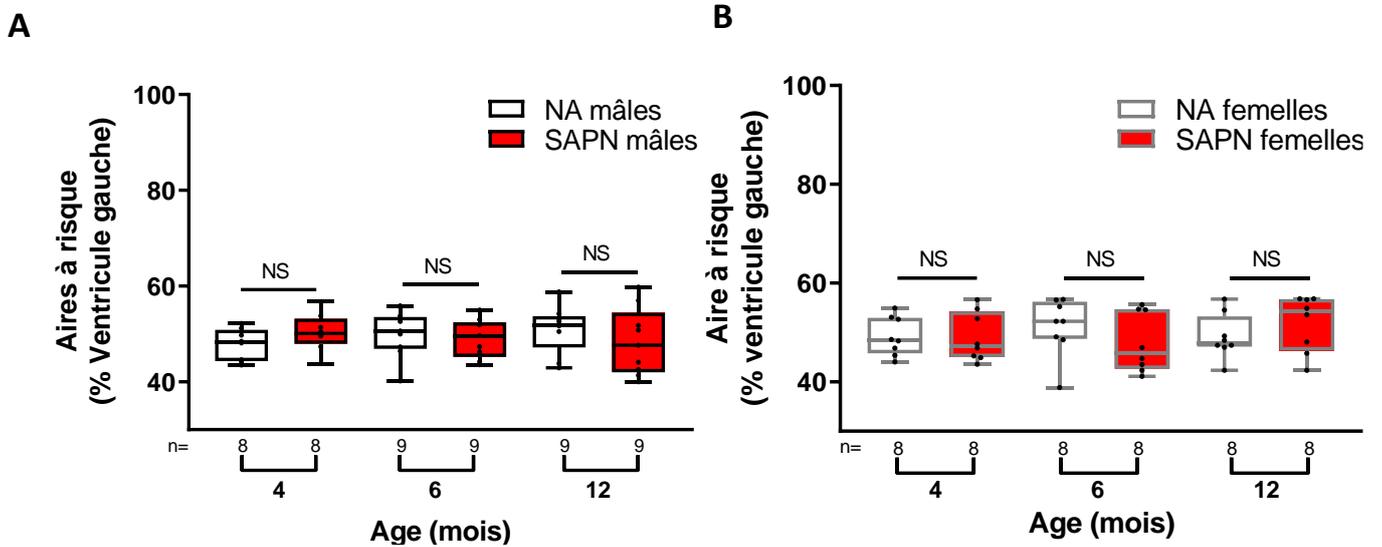


Figure 4 : Quantification des aires à risque des animaux NA et SAPN, mâles (A) et femelles (B) après une ischémie cardiaque de 45 min, suivie de 24 h de reperfusion.

Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. NS : Non significatif.

Toutes les AAR étaient similaires peu importe l'âge ou le sexe des animaux, avec une moyenne de $49,35 \pm 1,61\%$ pour les mâles et $49,73 \pm 1,83\%$ pour les femelles. Cette régularité nous a permis de comparer les tailles d'infarctus qui en découlaient.

(b) Taille de l'infarctus

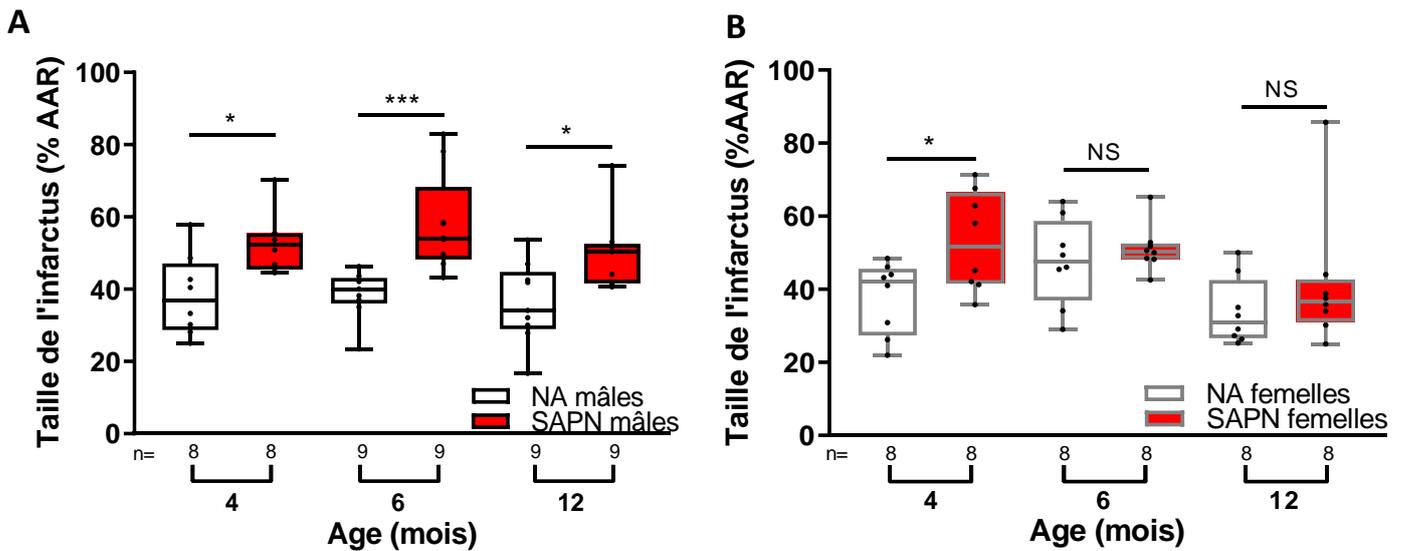


Figure 5 : Quantification des tailles d'infarctus des animaux NA et SAPN mâles (A) et femelles (B) après une ischémie cardiaque de 45 mins, suivi de 24h de reperfusion. Les graphiques représentent les médianes ± valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : p<0,05, * : P<0,001.**

La SAPN induit une augmentation significative de la TI chez les souris mâles par rapport aux souris NA à tous âges (4 mois : +27%, p<0,05 ; 6 mois : +34%, p<0,001 ; 12 mois : +27%, p<0,05) et uniquement chez les souris femelles de 4 mois (+29%, p<0,022).

La sensibilité des cœurs des souris mâles à une ischémie cardiaque *in vivo* était stable dans le temps, comme en témoignent les données (4 mois : NA 38,30 ± 3,98 %, SAPN : 52,74 ± 2,96 % ; 6 mois : NA : 38,69 ± 2,23 %, SAPN : 58,37 ± 4,51 % ; 12 mois : NA : 36,21 ± 3,73 % ; SAPN : 49,93 ± 3,45 %), mais plus variable pour les femelles (4 mois : NA : 37,75 ± 3,52 %, SAPN : 53,05 ± 4,80 % ; 6 mois : NA : 47,62 ± 4,24 %, SAPN : 50,50 ± 2,33 % ; 12 mois : NA : 38,86 ± 3,22 % ; SAPN : 41,38 ± 6,64 %). Il n'était pas observé de taille différente d'infarctus entre les mâles et les femelles.

5/ Métabolisme du glucose

(a) Glycémie basale

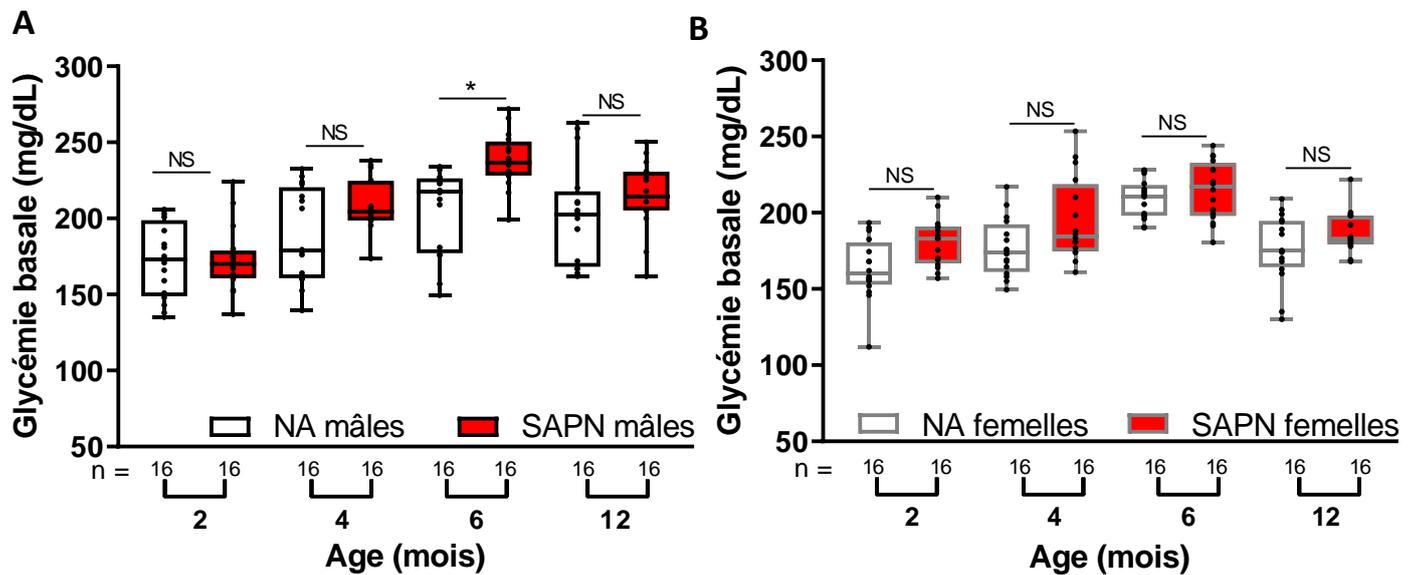


Figure 6 : Glycémie basale des animaux mâles (A) et femelles (B) après une mise à jeun de 6 heures. Les graphiques représentent les médianes \pm valeurs min et max. Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$.

La SAPN n'induit pas de modifications de la glycémie basale à jeun, sauf pour les mâles âgés de 6 mois par rapport à leur groupe contrôle. Les profils glycémiques à l'état basal étaient similaires entre les deux sexes aux différents âges.

(b) Test de tolérance au glucose : ipGTT

Le test de tolérance au glucose permet d'évaluer la réponse de l'organisme à une injection de glucose. Cette injection entraîne un pic glycémique immédiat, puis la glycémie doit diminuer plus ou moins lentement au cours du temps pour retrouver un niveau basal à l'issue du test (exemple en figure 7A). Une intolérance au glucose est suspectée lorsque le temps pour retrouver le niveau glycémique basal est allongé. Les aires sous la courbe (ASC) des deux groupes ont été calculées afin de comparer la réponse glycémique des souris NA et SAPN suite à une injection intrapéritonéale de glucose.

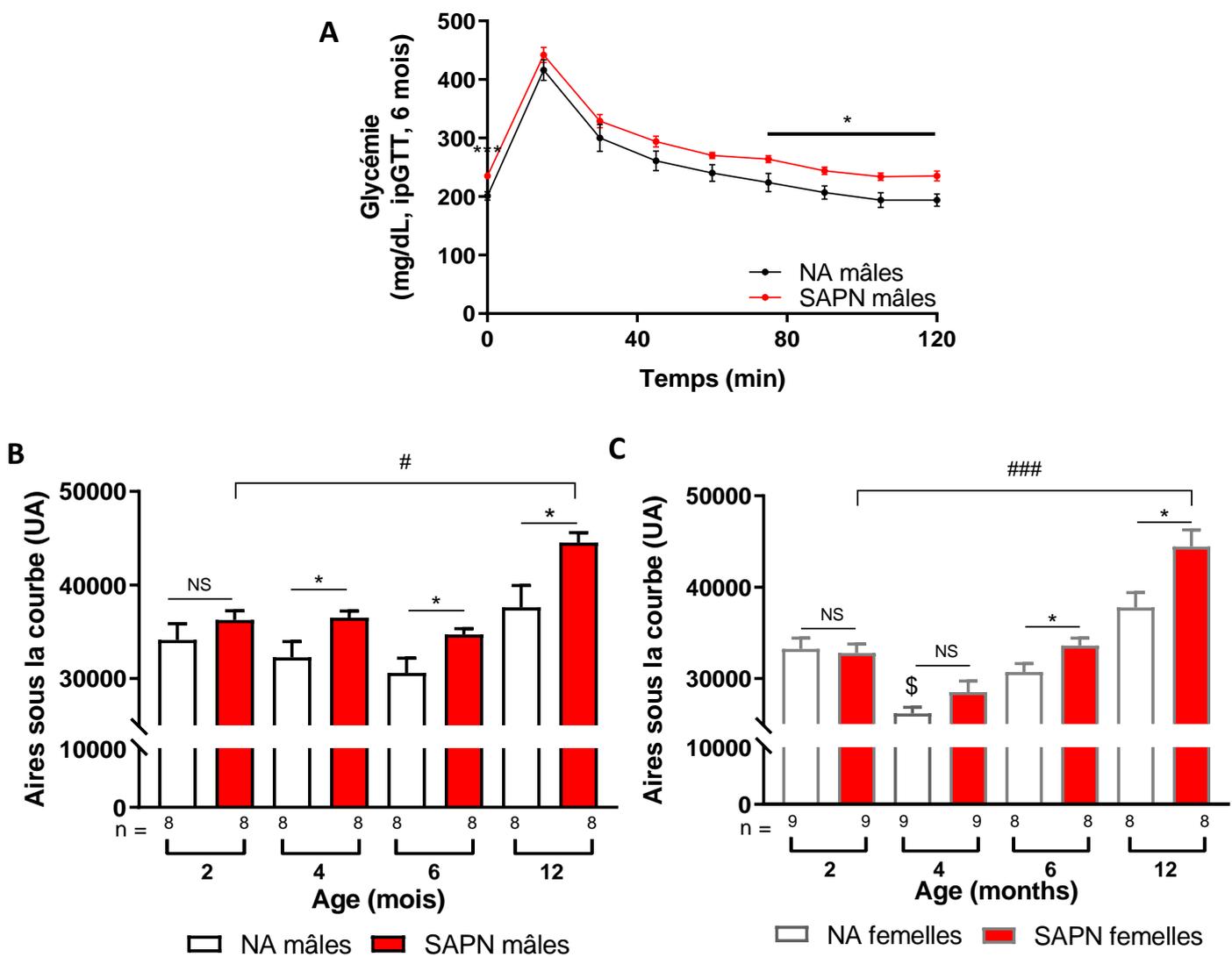


Figure 7 : Évolution de la glycémie (A) et aires sous la courbe (B, C) des animaux NA et SAPN à différents âges, chez les mâles (A, B) et les femelles (C) après injection intrapéritonéale de glucose (2 g/kg) lors d'un test de tolérance au glucose (ipGTT). Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$; * $p < 0,001$.**

Significativement différent au sein d'un même groupe mais d'âge différent : # : $p < 0,05$; ### : $p < 0,001$. Significativement différent du même groupe et du sexe opposé : \$: $p < 0,05$.

Pour les souris mâles, la SAPN induit une augmentation des ASC dès l'âge de 4 mois (+12%, $p < 0,05$) qui persiste chez des souris plus âgées (6 mois : + 12%, $p < 0,05$; 12 mois : + 16%, $p < 0,05$). Pour les femelles, la SAPN entraîne une hausse des ASC à 6 mois (+9%, $p < 0,05$) et jusqu'à 12 mois (+15%, $p < 0,05$). On note également que les ASC des animaux SAPN des deux sexes augmentent avec le temps (pour les mâles, 2 mois vs 12 mois : +19%, $p < 0,05$; pour les femelles : 2 mois vs 12 mois : +26%, $p < 0,001$). La réponse glycémique des femelles SAPN de 4 mois était diminuée par rapport à celle des mâles SAPN du même âge.

(c) Test de tolérance à l'insuline : ipITT

Afin d'évaluer la sensibilité à l'insuline, un test de tolérance à l'insuline a également été effectué sur le même principe que l'ipGTT. Suite à une injection d'insuline en ip, la glycémie diminue immédiatement, pour ensuite retrouver un niveau basal au cours du temps (exemple figure 8A). La résistance à l'insuline est suspectée lorsque le niveau glycémique basal est retrouvé rapidement.

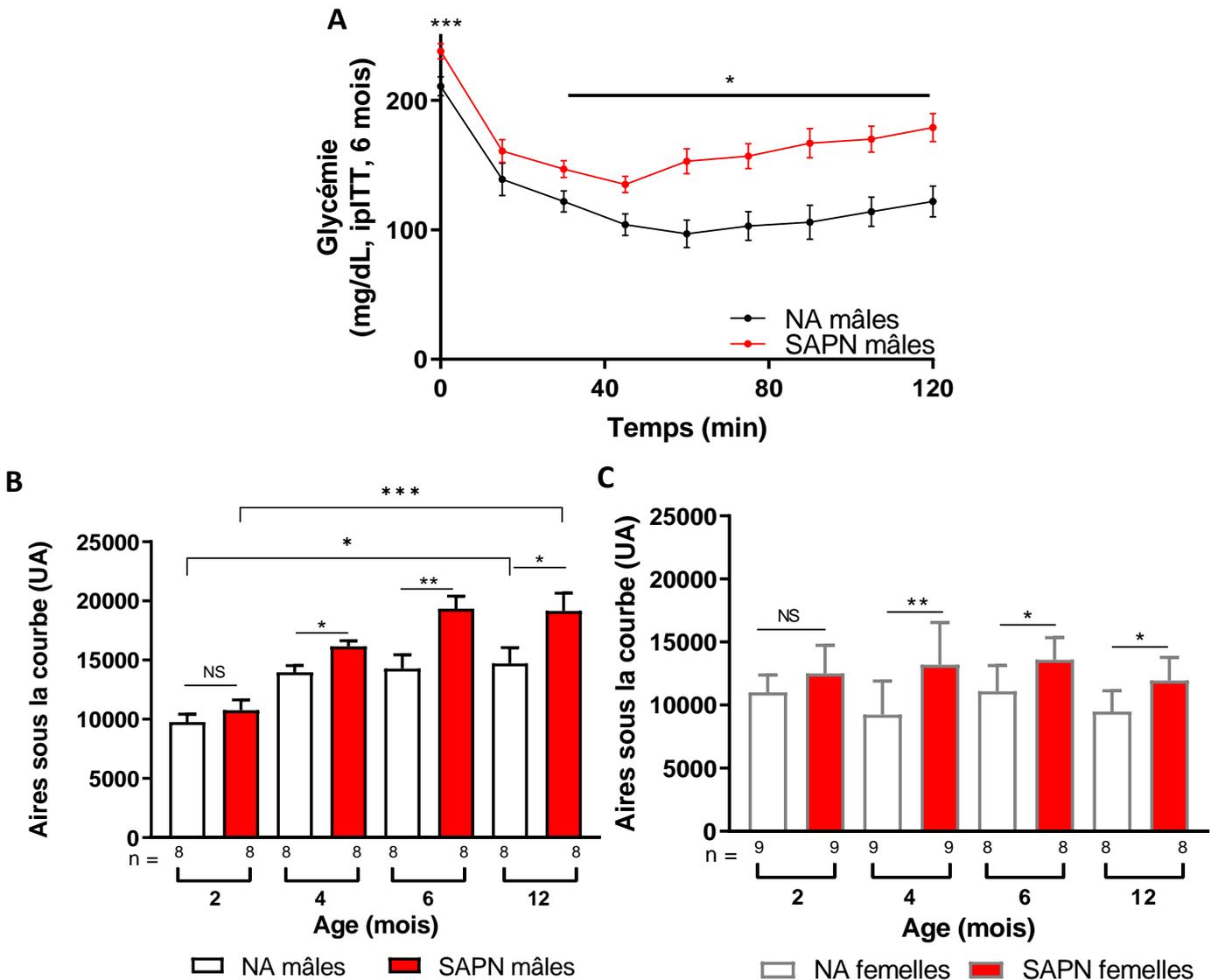


Figure 8 : Evolution de la glycémie (A) et aires sous la courbe (B, C) des animaux NA et SAPN à différents âges, chez les mâles (B) et les femelles (C) après injection intrapéritonéale d'insuline (0.75 UI/kg) lors d'un test de résistance à l'insuline (ipITT). Significativement différent du groupe NA de même sexe et âge : * : $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Significativement différent au sein d'un même groupe mais d'âge différent : # : $p < 0,05$; ### : $p < 0,001$.

Chez les souris mâles et femelles, la SAPN induit une augmentation des ASC par rapport aux groupes témoins dès l'âge de 4 mois (+ 13% pour les mâles, +30% pour les femelles) qui persiste aux différents âges étudiés (6 mois mâles : +26% ; 12 mois mâles : +23% ; 6 mois femelles : +18% ; 12 mois femelles : +20%). La réponse glycémique à une stimulation insulinique ne varie pas chez les femelles quel que soit leur âge, alors qu'elle s'accroît chez les mâles au cours du temps dans les deux groupes (2 mois vs 12 mois : NA : +34%, SA : +44%).

III/ Discussion

Le dimorphisme sexuel est un sujet de santé publique mondiale. Il est reconnu que les manifestations cliniques des MCV diffèrent entre les hommes et les femmes et que, même chez des individus en bonne santé, il existe des différences structurales et fonctionnelles cardiaques précoces entre les sexes [269]. De plus, les troubles gestationnels en lien avec l'alimentation maternelle [260, 270] mais également des perturbations environnementales postnatales [265, 271] sont associés à des altérations spécifiques liées au sexe dans le développement du cœur.

Dans ce deuxième travail, nous avons mis en évidence que la SAPN induisait une augmentation précoce (dès le 24^{ème} jour de vie) et permanente (jusqu'à 18 mois) du PC des animaux mâles et femelles. Toutefois, le PC des animaux mâles était supérieur à celui des femelles après 2 mois, ce qui est en concordance avec la plupart des constatations relatives au poids des rongeurs mâles par rapport à celui des femelles. Ces résultats sont en accord avec les études préalables de notre équipe et d'autres, qui ont observé que les souris (mâles mais aussi femelles) ayant subi une SAPN, présentaient des modifications des circuits hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la prise de nourriture et de la satiété, qui induit une augmentation de la prise alimentaire. De précédents travaux issus de notre laboratoire, conduits uniquement chez les mâles SAPN âgés de 6 à 8 mois, ont corrélé cette hausse du PC avec une augmentation de la masse grasse, au détriment de la masse maigre [167, 270]. Dans le présent travail, l'augmentation du PC s'accompagne d'une hausse de la masse du TAP, uniquement chez les souris mâles de plus de 6 mois. Une tendance similaire est observée chez les femelles, mais la variabilité interindividuelle des données de TAP rend les résultats moins concluants. Cependant, il est intéressant de noter que la masse du TAP augmente plus avec l'âge chez les femelles que chez les mâles, atteignant 6% du poids corporel à l'âge de 12 mois. Ainsi, en vieillissant, les souris femelles développeraient une masse de graisse viscérale péricardique plus importante que les mâles. Des études cliniques ont montré par des mesures tomographiques que les femmes avaient un pourcentage d'adiposité plus élevé que les hommes, mais que sa répartition était majoritairement sous cutanée pour les femmes, alors qu'elle serait plutôt viscérale pour les hommes [272-274]. Des études complémentaires seraient nécessaires pour étudier par échographie, scanner ou IRM la localisation de l'adiposité aux différents âges chez nos animaux des deux sexes.

Les données échocardiographiques ont permis de mettre en évidence une diminution de près de 8 % de la FEVG chez les animaux SAPN, débutant à l'âge de 4 mois et persistant jusqu'à 12 mois, indépendamment du sexe des animaux. La FEVG moyenne des souris témoins mâles adultes était de l'ordre de 65%, et celle des femelles d'environ 68%. La diminution modérée de la FEVG observée chez les souris SAPN ne peut s'apparenter à une IC à fraction d'éjection altérée car elle reste au-dessus des 40%, mais pourrait être considérée comme une IC à fraction d'éjection préservée. Nos résultats sur les souris témoins des deux groupes et des deux sexes sont cohérents avec les données échocardiographiques publiées chez l'Homme, puisqu'elles ne montrent pas d'altération plus importante de la FEVG chez les animaux plus âgés. Néanmoins, chez l'Homme, le vieillissement altère de façon profonde la capacité fonctionnelle du muscle cardiaque : perte d'élasticité, de contractilité, diminution de l'activité mitochondriale et du débit cardiaque de 30 à 40 %, calcification valvulaire etc. Les comorbidités telles que le diabète, l'obésité et l'HTA accélèrent encore le processus de vieillissement cardiaque. Il pourrait être intéressant d'explorer plus en profondeur ces paramètres morphologiques et fonctionnels cardiaques impactés par l'âge dans le cadre d'un syndrome métabolique induit par une SAPN chez le rongeur. Le cœur des femelles SAPN présentait également une dilatation transitoire du VG (à 4 et à 6 mois), non observée chez les mâles, avec des diamètres internes supérieurs à ceux du groupe contrôle NA. Aucune hypertrophie cardiaque induite par la SAPN n'a été observée, aussi bien chez les mâles que les femelles, contrairement à d'autres travaux qui avaient montré une hypertrophie cardiaque, mais sur une autre souche de souris, la souris Swiss. Les conclusions de ces auteurs reposent sur la description d'une augmentation du rapport du poids du cœur sur la longueur du tibia mais également par une majoration de l'expression cardiomyocytaire des ARNm de marqueurs d'hypertrophie, tels l'ANP (Atrial natriuretic peptide) et le BNP (Brain natriuretic peptide) [169]. La discordance des résultats pourrait être attribuable à la souche de souris étudiée [275].

Par ailleurs, après une séquence d'ischémie-reperfusion cardiaque *in vivo*, la SAPN a entraîné des infarctus plus massifs que chez les NA chez les mâles, quel que soit leur âge, mais chez les souris femelles, on observait cette augmentation de la sensibilité à l'ischémie uniquement chez de jeunes femelles SAPN âgées de 4 mois. Ces données suggèrent que la sensibilité des cœurs aux lésions d'ischémie reperfusion serait dépendante du sexe chez les

animaux ayant subi une SAPN. De nombreuses études soulignent l'importance des hormones sexuelles féminines, plus particulièrement l'œstradiol, et de leurs interactions complexes dans la protection cardiaque face aux MCV [276-278]. Dans un contexte d'ischémie cardiaque, les œstrogènes stimuleraient la respiration mitochondriale et participeraient à la réduction du stress oxydant par activation des enzymes antioxydantes glutathion peroxydase (GPx) et superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD) [279-281]. Dans ce travail, la mesure plasmatique des différents types d'œstrogènes n'a pas apporté de données concluantes (résultats non montrés), avec des variabilités importantes au sein de chaque groupe (mâles et femelles). Un dosage plus restrictif et sensible de l'œstradiol aurait peut-être permis d'obtenir des résultats plus précis et de corrélérer à ses taux la sensibilité aux lésions d'I-R *in vivo*. De plus, les taux plasmatiques d'œstrogènes varient en fonction du cycle ovarien des femelles d'un même groupe, participant à la variabilité de nos données. Ainsi, dans notre étude, la présence seule des œstrogènes n'est pas suffisante pour expliquer la moindre sensibilité à l'infarctus de souris SAPN femelles. En outre, nos résultats sur les souris témoins (NA) ne montrent pas de taille d'infarctus différente entre les mâles et les femelles, quel que soit leur âge. Si l'incidence des MCV est plus importante chez les hommes que chez les femmes non ménopausées, rien n'indique cependant que pour une même étendue d'ischémie cardiaque, l'atteinte tissulaire et donc la taille de l'infarctus soit différente selon les sexes.

Nos travaux montrent en outre que la taille de l'infarctus n'est pas significativement modifiée dans un même groupe de souris lorsque les souris sont plus âgées, qu'il s'agisse de mâles ou de femelles. Ce résultat semble contre-intuitif, puisqu'on considère généralement que le vieillissement aggrave les lésions ischémiques. Chez l'Homme octogénaire, les traits de caractéristiques du syndrome coronarien aigu sont hétérogènes et atypiques par rapport à ceux des patients plus jeunes (60 ans), pouvant aboutir à une détection et à une prise en charge retardée et menant à une mortalité hospitalière multipliée par trois ou quatre [254, 282]. L'étude de Framingham a montré que le sexe jouerait un rôle dans la mortalité hospitalière liée à l'infarctus du myocarde avec 28 % de mortalité pour le sexe féminin contre 16% pour le sexe masculin [283]. Dans notre étude, les souris de 12 mois ne présentent pas de signes caractéristiques du vieillissement, et les femelles n'ont pas d'interruption de leurs cycles sexuels. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'elles ne sont pas encore suffisamment

âgées et que l'utilisation de souris de 18 à 24 mois pourrait être envisagée afin d'apprécier les effets du vieillissement sur la sensibilité à l'ischémie cardiaque.

L'altération du métabolisme du glucose exerce un impact sur la fonction cardiovasculaire. Dans ce travail de Thèse, nous avons mis en évidence pour la première fois qu'une SAPN entraînait une intolérance au glucose dès 4 mois chez les mâles, et à partir de 6 mois chez les femelles ainsi qu'une résistance à l'insuline dès 4 mois aussi bien chez les mâles que chez les femelles SAPN. Il est intéressant de souligner que l'intolérance au glucose s'accroît chez les souris âgées (12 mois) des deux sexes, alors que la résistance à l'insuline ne s'accroît avec l'âge que chez les mâles de 12 mois. D'autres études ont montré que les souris adultes SAPN mâles présentaient des changements dans la signalisation périphérique de l'insuline, tels qu'une régulation négative du substrat 1 du récepteur de l'insuline (IRS-1), d'Akt et du transporteur de glucose 4 (GLUT4) dans le tissu adipeux blanc et le muscle squelettique [193], réduisant ainsi l'entrée du glucose dans les cellules et renforçant le phénotype de résistance à l'insuline chez ces souris.

Enfin, d'autres travaux ont montré que la SAPN engendrait, de façon indépendante du sexe, une altération du métabolisme des lipides déterminée par l'augmentation des taux plasmatiques de cholestérol, d'HDL cholestérol, d'insuline et de leptine [167, 188, 284].

Les données obtenues dans ce travail sur le dimorphisme sexuel dans notre modèle de SAPN restent majoritairement fonctionnelles et descriptives. Il serait important d'aborder les mécanismes moléculaires susceptibles d'être impliqués de manière directe et indirecte dans les adaptations métaboliques qui participent aux incidences fonctionnelles cardiovasculaires programmées par la SAPN.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les objectifs de ce travail de thèse ont été 1) d'identifier les impacts à court et long termes d'une SAPN chez des souris mâles, âgées de 2 à 18 mois, puis 2) de rechercher un éventuel dimorphisme sexuel dans notre modèle de SAPN. Dans cette discussion générale, pour éviter la redondance de mes propos, je discuterai des principaux résultats obtenus dans mes deux études en abordant plus précisément le rôle central des déséquilibres de la balance glucose/insuline, du stress oxydant et de l'inflammation au sein des altérations cardiaques et métaboliques induites par la SAPN.

Le premier résultat majeur de notre étude est **l'augmentation indépendante du sexe du PC des animaux SAPN**, qui s'apparente plus à un **surpoids** qu'à une obésité et qui est l'élément central des altérations cardio-métaboliques qui en découlent. Les causes de ce surpoids sont multiples et mettent notamment en jeu des altérations très précoces des **circuits hypothalamiques régulant l'appétit et la satiété**. Les voies anorexigènes impliquant POMC [182, 184] et la leptine [156] seraient diminuées. Toutefois, la majorité des études, y compris celles émanant de notre laboratoire, décrivent une hyperleptinémie chez les animaux SAPN ; cependant, il a été par ailleurs clairement démontré que celle-ci est associée à une résistance centrale à la leptine via une diminution du nombre de récepteurs à la leptine [186, 188-190]. L'altération pérenne des voies hypothalamiques orexigènes et anorexigènes serait reliée à des mécanismes épigénétiques. En effet, plusieurs études réalisées chez les rongeurs SAPN âgés de 21 jours ont corrélé positivement l'augmentation du PC, de l'adiposité, des taux plasmatiques de glucose, d'insuline et de leptine avec une hyperméthylation des promoteurs des gènes de la POMC et du récepteur à l'insuline, conduisant à une réduction de leur expression en ARNm [182, 285]. L'inactivation de ces gènes anorexigènes favorise la prise alimentaire et par conséquent l'augmentation du poids corporel, mais elle pourrait également en partie expliquer la résistance centrale à l'insuline observée chez les individus adultes [286]. Des résultats similaires ont été observés chez la descendance de mères nourries avec un régime high-fat pendant les périodes de gestation et de lactation [287], suggérant que l'obésité maternelle et la SAPN pourraient exercer des effets de programmation épigénétique similaires [288]. Enfin, selon certaines études, les modifications épigénétiques induites par la SAPN seraient dépendantes du sexe chez l'animal [184]. Parallèlement, il a été montré que chez les rongeurs soumis à une SAPN les voies orexigènes sont stimulées via l'augmentation

de la voie NPY/AgRP et celle de la galanine [185, 186] ce qui contribue à l'augmentation de la prise alimentaire et du PC.

Dans le cadre de la SAPN, **l'adiposité** augmente conjointement avec le PC, au détriment de la masse maigre [167]. Des données expérimentales ont montré que le WAT des rongeurs SAPN libérait plus de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- α et le PAI [195] et que l'entrée du glucose stimulée par l'insuline était diminuée dans l'adipocyte à cause d'une réduction d'IRS-1, de l'inhibition de la translocation membranaire de GLUT4 et GLUT1 et de l'inactivation de la voie PI3K/Akt [193, 194]. Dans notre premier travail nous n'avons pas évalué le statut inflammatoire général du WAT épидидymal, périrénal ou sous-cutané ; cependant nous nous sommes intéressés au **TAP** et avons observé une **augmentation de sa masse et de son statut pro-inflammatoire chez les souris mâles SAPN adultes et vieillissantes**. Cet état pro-inflammatoire, caractérisé par l'augmentation des expressions géniques du TNF- α et de l'IL-6 pourrait exercer une influence paracrine sur le cœur et/ou favoriser un stress oxydant local.

Dans ce travail, **la fonction systolique des souris SAPN était altérée de façon similaire chez les animaux des deux sexes**. La dysfonction systolique observée chez les mâles SAPN pourrait être mise en relation avec de précédents résultats issus de notre laboratoire, qui ont décrit la présence d'une fibrose cardiaque chez des individus SAPN mâles adultes [169, 170]. Cette fibrose était associée à une plus grande quantité de collagène cardiaque et à une expression et une activité accrue des métalloprotéinases de type 2 (MMP-2) [171]. L'activine A est considérée comme un facteur favorisant le développement de la fibrose cardiaque, cependant, dans notre étude, ses taux d'expression génique et sa concentration plasmatique sont diminués. Nos résultats diffèrent de ceux d'autres études qui ont montré que la surproduction de l'activine A par le TAE de patients diabétiques participait à la résistance cardiaque à l'insuline [138], au développement d'une insuffisance cardiaque par une altération de l'homéostasie calcique [140] et aurait des effets pro-fibrotiques et pro-oxydants [137, 289]. Ce mécanisme de remodelage pourrait cependant être stimulé par les taux de **leptine** plus élevés et par le **stress oxydant**, qui sont également augmentés chez les souris adultes SAPN par rapport aux souris NA [171]. Ces résultats ont été majoritairement obtenus chez des rongeurs mâles adultes, et pourraient tout à fait être explorés sur le plasma ou les échantillons tissulaires issus de femelles ou d'individus plus vieillissants, permettant ainsi

d'expliquer la dysfonction systolique induite par la SAPN retrouvée à tout âge dans les deux sexes.

Par ailleurs, **le cœur des animaux SAPN est plus sensible aux lésions d'ischémie-reperfusion induites *in vivo*, mais ces résultats dépendent du sexe**, puisqu'il apparaît une sensibilité plus importante pour les cœurs des mâles SAPN que pour les femelles du même groupe. Dans ce travail, nous avons en outre observé, sur des cœurs « naïfs » (non soumis à une ischémie-reperfusion) de souris mâles, que l'expression génique des voies RISK et SAFE était altérée par la SAPN, et plus particulièrement **la voie SAFE**, avec une diminution précoce et persistante de l'expression génique de STAT3. L'altération de cette voie de cardioprotection pourrait en partie expliquer pourquoi les cœurs des mâles SAPN sont plus sensibles aux lésions d'IR que le groupe témoin. Toutefois, ces données sont actuellement manquantes chez les femelles, mais il serait pertinent d'étudier ces voies cardioprotectrices dans des échantillons de cœurs naïfs issus d'individus femelles.

Néanmoins, les **lésions d'IR** impliquent également (i) des phénomènes inflammatoires via l'infiltration du tissu cardiaque par des neutrophiles [290], (ii) une surcharge calcique qui, avec l'inflammation, participe au développement d'un **stress oxydant** local par l'activation d'enzymes pro-oxydantes comme les NADPH oxydases, les xanthines oxydases et les NOS [291-293]. L'activation des NOS ou leur découplage, dans un contexte inflammatoire, est considéré comme le mécanisme principal par lequel les cytokines participent à l'altération de la fonction contractile cardiaque [290]. On peut émettre l'hypothèse que les femelles, encore en âge de se reproduire, sont protégées par les hormones sexuelles, notamment l'estradiol, pour lesquelles les récepteurs ont été retrouvés au sein des cardiomyocytes [294]. Chez les rates, la fixation de l'estradiol sur son récepteur ER β active la voie PI3K/Akt et dirige la cellule vers la survie [41, 295]. Cependant, dans notre étude, nous n'observons pas de différence de taille d'infarctus entre les mâles et les femelles au sein de nos groupes témoins NA. Ces résultats sous-entendent que les mécanismes protecteurs mis en place dans les cœurs des femelles SAPN n'impliquent pas uniquement la cardioprotection par l'estradiol, mais pourraient prendre en compte des niveaux de stress oxydant plus faibles au sein du myocarde déjà démontré par d'autres équipes, grâce notamment à une activité accrue de la SOD2 [296] et à l'activation de la voie RISK, impliquant PI3K et ERK1/2 [297].

Le modèle de SAPN chez les rongeurs est robuste, reproductible et répétable, et nos résultats ainsi que ceux obtenus par de nombreuses équipes s'accordent à dire qu'il conduit au développement d'un **syndrome métabolique** [156, 157, 167, 171, 298]. Quelques variations peuvent être cependant être observées selon l'espèce de rongeur utilisée : les rats suralimentés présentent une élévation des taux plasmatiques de glucose à jeun, mais aussi d'insuline [179, 185, 299]. Dans notre travail conduit chez la souris, si l'insulinémie était augmentée significativement, la glycémie à jeun n'était pas modifiée, un résultat déjà observé par Kappeler *et al* en 2009 [188]. Ces anomalies de l'équilibre glycémique sont classiquement rencontrées chez les rongeurs ayant subi une SAPN, et se caractérisent par un **déséquilibre de la balance glucose/insuline**, mis en lumière dans ce travail par les résultats de nos tests de tolérance au glucose et de résistance à l'insuline (ipGTT et ipITT). En effet, suite à une hyperglycémie provoquée, les souris mâles et femelles SAPN augmentent plus rapidement leur glycémie qui revient plus lentement aux valeurs initiales [156, 192, 299, 300], soulignant une intolérance au glucose. De même, l'injection d'insuline induit une diminution de la glycémie plus lente et un retour à la ligne de base plus rapide pour les souris SAPN mâles et femelles par rapport aux groupes contrôles, témoignant d'une forme de résistance à l'insuline. Il est admis que le déséquilibre de la balance glucose/insuline peut être à l'origine d'altérations cardiaques importantes, portant le nom de **glucotoxicité** [301, 302]. Les mécanismes de cette glucotoxicité mériteraient d'être étudiés au sein de notre modèle, chez les individus des deux sexes, car de nombreuses études réalisées sur des cœurs ou des cardiomyocytes isolés issus de modèles rongeurs d'obésité (high-fat diet, souris ob/ob) ont montré que la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie affectaient (i) la fonction cardiaque en favorisant une surcharge calcique par réduction de l'activité de SERCA2 [303, 304] ; (ii) la fibrose cardiaque [305] ; (iii) le métabolisme énergétique cardiaque en diminuant d'une part la signalisation insulinique par réduction de l'activation PI3K/Akt et d'autre part en rendant le switch métabolique plus difficile en conditions pathologiques (« inflexibilité métabolique ») notamment lors d'une IR [306, 307].

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Nos résultats indiquent que SAPN par réduction de la taille des portées engendre une programmation à court et long terme du risque cardio métabolique. Notre étude a démontré que les souris SAPN présentaient de façon très précoce un surpoids, qui s'accompagne d'une augmentation du volume du TA et notamment du TAP, dont le profil inflammatoire est altéré, pouvant influencer de façon paracrine la fonction cardiaque. En outre, les souris SAPN développeraient très précocement mais durablement une dysfonction contractile cardiaque, caractérisée par une diminution modérée de la FEVG et associée à une plus grande susceptibilité aux lésions d'ischémie reperfusion myocardiques induites *in vivo*. Le métabolisme du glucose est également altéré par la SAPN, avec l'instauration précoce et durable d'une intolérance au glucose et d'une résistance à l'insuline. L'ensemble de ces altérations regroupe certaines des caractéristiques du **syndrome métabolique** tel qu'il est décrit chez l'Homme, suggérant que le modèle de SAPN par réduction de la taille des portées serait un **outil expérimental original, naturel et pertinent** pour l'étude du syndrome métabolique dont la prévalence ne cesse de croître dans le monde. Des études physiopathologiques et thérapeutiques pré-cliniques pourraient être envisagées afin d'étudier l'impact protecteur sur la fonction cardiaque de certains médicaments tels que les inhibiteurs du cotransporteur sodium glucose de type 2 (iSGLT2) ou encore les agonistes du glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Cependant, nos résultats évoquent des altérations dépendantes du sexe avec une plus grande variabilité des données chez les individus femelles et un éventuel impact protecteur des hormones féminines. Des données complémentaires sont nécessaires pour expliquer cette différence impliquant le sexe des animaux.

Enfin, le stress oxydant, la surcharge calcique, la dysfonction endothéliale et l'inflammation sont des mécanismes clés de l'altération cardiométabolique induite par la SAPN. Des différences d'expressions des voies de signalisation impliquées dans ces mécanismes pourraient expliquer le dimorphisme sexuel observé dans notre étude. Des expérimentations complémentaires de ces voies sont en cours au laboratoire, et les résultats de ces travaux pourront apporter des éléments de réponse pertinents futur.

De surcroît, lorsqu'on évoque la situation de « programmation » périnatale du risque cardiovasculaire, le concept de changements d'ordre épigénétique se doit d'être évoqué. Nous n'avons pas dans ce travail de Thèse procédé à ce type d'études pour apprécier de quelle manière des méthylations géniques, expressions de microARN, ou modifications d'histones

aient pu s'établir dans notre modèle. Il apparaît nécessaire que des explorations de ces mécanismes puissent être entrepris. Ainsi, le séquençage de l'épigénome des animaux grâce à l'utilisation de techniques telles que l'HPLC, la technique ELISA ou encore la LC-MS permettraient un profilage complet des méthylations du génome et l'identification de marqueurs spécifiques induits par la SAPN. Chez l'Homme, le suivi de l'évolution de l'épigénome de patients jeunes, adultes et plus âgés, atteints d'obésité, pourrait mettre en évidence la spécificité de certaines de ces marques épigénétiques induites par un environnement nutritionnel riche pendant les périodes fœtales et postnatales.

En outre, il serait également pertinent de travailler sur des cardiomyocytes isolés de cœurs de souris SAPN afin d'identifier les voies de signalisation cellulaires cardiaques mises en jeu dans la dysfonction contractile induite par la SAPN. Enfin, chez la souris, l'identification des différentes populations cellulaires cardiaques par cytométrie en flux associée à des études moléculaires des marqueurs hypertrophiques cardiaques, comme l'ANP ou le BNP, nous permettrait d'obtenir des informations sur la composition et la morphologie des cellules cardiaques qui pourraient être altérées par une SAPN.

En conclusion, une SAPN transitoire de 21 jours après la naissance entraîne des effets cardio-métaboliques observables jusqu'à 18 mois après la naissance, à la fois chez les individus mâles et femelle, soulignant l'importance de la période de lactation en tant que fenêtre temporelle sensible aux troubles métaboliques conditionnant une bonne structuration myocardique et vasculaire, un métabolisme adéquat et une réponse appropriée aux circonstances pathologiques à l'âge adulte.

ANNEXES

Sommes-nous programmés dès les premiers jours à développer des maladies cardiovasculaires ?

Are we scheduled from the first days to develop cardiovascular diseases ?

6
10 **Q1** E. Rigal
18 M. Josse
19 C. Vergely
13

Physiopathologie et épidémiologie cérébro-cardiovasculaires (PEC2), université de Bourgogne, faculté des sciences de santé, 7, boulevard Jeanne-d'Arc, 21000 Dijon, France

Disponible en ligne sur ScienceDirect le xxx

17
18 **L**a période foetale et postnatale immédiate
19 est déterminante dans l'orientation ulté-
20 rieure de la santé cardiovasculaire et métabo-
21 lique d'un individu. En effet, en plus des
22 différents éléments hérités du génome paren-
23 tal qui peuvent ou non prédisposer à des
24 pathologies cardio-métaboliques, pendant la
25 grossesse, l'environnement nutritionnel et hor-
26 monal joue lui aussi un rôle essentiel pour
27 modeler de manière pérenne l'expression
28 des gènes du fœtus ou du nouveau-né. Dans
29 ce cadre, depuis une vingtaine d'années, de
30 nombreuses études scientifiques se sont
31 intéressées à l'impact de l'environnement
32 nutritionnel pendant les périodes de crois-
33 sance et de développement critiques que sont
34 les périodes foetales et postnatales, sur le
35 développement des maladies à l'âge adulte.
36 Les premiers travaux épidémiologiques,
37 conduits par l'équipe de David Barker, ont
38 établi un lien très clair entre une situation de
39 sous-nutrition pendant la période foetale, sou-
40 vent liée à une nutrition insuffisante de la mère
41 pendant la grossesse, et la survenue d'un
42 surpoids, d'une insulino-résistance et d'une
43 augmentation de la prévalence de maladies
44 cardiovasculaires à l'âge adulte [1-5]. Ces
45 travaux, corroborés par ceux de nombreuses
46 autres équipes, ont été par la suite étendus
47 à d'autres types de perturbations nutritionnel-
48 les pendant la grossesse qui se rencontrent
49 lors du diabète gestationnel ou de l'obésité
50 maternelle [6]. En effet, relié à sa mère par
51 le cordon ombilical et dépendant uniquement
52 des échanges foetoplacentaire pour son ali-
53 mentation, le fœtus est particulièrement sen-
54 sible aux perturbations nutritionnelles [7].
Ainsi, l'exposition du fœtus à une sous- ou

suralimentation mais aussi à des perturba-
teurs endocriniens, ou à certains composants
toxiques sont des déterminants clés du déve-
loppement ultérieur de pathologies [8]. Dans
les années 2000, le concept des « origines
développementales de la santé », le DOHaD
pour Developmental Origins of Health and
Diseases, a émergé [9,10], introduisant l'idée
d'une potentielle origine foetale des maladies
de l'adulte. Ce concept établit une relation
entre l'environnement utérin (incluant les
périodes embryonnaire et foetale) et une sus-
ceptibilité accrue aux maladies chroniques
à l'âge adulte et introduit l'idée d'une « pro-
grammation » d'un individu à un certain phé-
notype à l'âge adulte [11].

Ces modulations du phénotype de l'individu
s'effectuent selon des mécanismes dits épi-
généétiques qui, sans changer le génome de
l'individu, vont modifier l'expression de son
patrimoine génétique en fonction de facteurs
environnementaux hormonaux et/ou nutrition-
nels [12]. Ces changements épigénétiques
peuvent parfois s'avérer essentiels pour adap-
ter le fœtus à l'environnement intra-utérin et
postnatal, mais, dans certains cas, ils prédis-
posent l'organisme à développer des dysfon-
ctionnements ou des maladies lorsque les
modifications obtenues ne sont pas cohéren-
tes avec l'environnement de l'individu [13,14].
Si un grand nombre de travaux épidémiologi-
ques, cliniques et expérimentaux ont porté sur
l'influence de l'environnement prénatal, forte-
ment lié au statut nutritionnel de la mère lors
de la grossesse, sur la survenue de pathologi-
es de l'adulte, il semble que la naissance ne
constitue pas un point de non-retour de ces
phénomènes de programmation. Ainsi,

Auteur correspondant.
Adresse e-mail :
eve.rigal@u-bourgogne.fr

<https://doi.org/10.1016/j.amcp.2023.09.012>
© 2023 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1

Pour citer cet article : Rigal E, et al. Sommes-nous programmés dès les premiers jours à développer des maladies cardiovasculaires ? Arch Mal Coeur Vaiss Prat (2023), <https://doi.org/10.1016/j.amcp.2023.09.012>

Physiopathologie cardiovasculaire

E. Rigal et al.

l'environnement nutritionnel pendant la période postnatale peut aussi avoir un impact majeur sur la santé des individus [4]. En effet, il a été montré que des nouveaux-nés présentant une prise de poids importante après la naissance étaient plus susceptibles de présenter un surpoids, une élévation de la pression artérielle, ainsi qu'un syndrome métabolique [15,16]. Le concept du DOHaD a donc été étendu de la conception de l'enfant à ses deux ans, soit les « 1000 premiers jours ». Toutefois, les études cliniques sur la programmation postnatale sont à ce jour peu nombreuses et ne permettent pas d'en explorer l'impact précis sur le cœur, ni d'en approcher les mécanismes. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux, notamment chez le rongeur, a permis de contourner cette difficulté et d'apporter des informations essentielles sur l'influence de l'environnement nutritionnel postnatal sur le système cardiovasculaire [17,18].

Au sein de notre équipe de recherche, l'impact d'une SurAlimentation PostNatale (SAPN) de 21 jours chez le rat ou la souris se manifeste par des changements cardiaques très précoces : dès le 24^e jour de vie, de nombreux gènes cardiaques voient leur expression accrue ou diminuée, un stress oxydant est présent [19] et le nombre de cardiomyocytes totaux est diminué lors du sevrage (données non publiées). Il faut noter que, pendant la période fœto-embryonnaire, le cœur se développe par des phénomènes de division/multiplication de tous ses types cellulaires, mais qu'au moment de la naissance, les cardiomyocytes vont très rapidement cesser de se multiplier, bloquer leur cycle cellulaire et le cœur augmentera sa taille par des mécanismes d'hypertrophie des cardiomyocytes et de multiplication des autres types cellulaires (cellules vasculaires, fibroblastes...). Nos travaux les plus récents indiquent qu'une suralimentation juste après la naissance accélère ce mécanisme bloquant la prolifération des cardiomyocytes, ce qui aboutit à un cœur présentant un nombre initial de cardiomyocytes moins important. Quand on sait que, par la suite, ces cardiomyocytes ne pourront pas se régénérer lorsqu'ils seront détruits, on peut envisager les conséquences dramatiques d'un tel événement. Ainsi, ces changements précoces vont prédisposer le cœur à des troubles fonctionnels plus tardifs. En effet, nous avons démontré qu'à l'âge adulte, les souris ayant subi une SAPN présentent une diminution de la fonction contractile du ventricule gauche associée à une dilatation de sa cavité et une plus grande sensibilité cardiaque aux lésions d'ischémie reperfusion induites ex vivo mais également in vivo [19-21]. De très récents travaux, non publiés à ce jour, indiquent que les souris SAPN adultes soumises à une SAPN développeraient aussi des troubles du rythme cardiaque : tachycardie, altérations de l'électrocardiogramme, mais aussi prédisposition à une fibrillation atriale spontanée ou stimulée.

Le cœur n'est pas le seul organe impacté par la SAPN. Les souris SAPN présentent également un surpoids, des anomalies de la régulation du glucose (résistance à l'insuline et intolérance au glucose) associées à une élévation de la pression artérielle, des taux sanguins de leptine et de cholestérol augmentés, ainsi qu'un stress oxydant circulant et cellulaire [20,22]. Ces différents éléments regroupent les caractéristiques du syndrome métabolique, dont la prévalence chez l'Homme ne cesse d'augmenter au fil des ans.

Pour conclure, le développement du fœtus mais aussi les déterminants de sa santé cardiovasculaire et métabolique à l'âge adulte sont intimement dépendants de l'environnement pré-conceptuel, intra-utérin et postnatal et donc des éléments

relatifs au bon état de santé de sa mère avant, pendant et après la grossesse. Expérimentalement, des changements nutritionnels précoces, même de courte durée, pendant les périodes critiques où les cardiomyocytes continuent de proliférer [23,24], peuvent avoir un impact définitif sur la constitution du cœur et donc sur sa capacité à faire face à un stress pathologique comme celui de l'ischémie [18]. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent cette programmation sont encore mal connus et nécessitent des études complémentaires pour mieux les identifier.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

RÉFÉRENCES

- [1] Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 1990;301:1111.
- [2] Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995;311:171-4.
- [3] Hales CN, Barker DJ, Clark PM, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ* 1991;303:1019-22.
- [4] Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 1989;2:577-80.
- [5] Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989;298:564-7.
- [6] Mitancher D, Burguet A, Simeoni U. Infants born to mothers with gestational diabetes mellitus: mild neonatal effects, a long-term threat to global health. *J Pediatr* 2014;164:445-50.
- [7] Barker DJ, Gluckman PD, Robinson JS. Conference report: fetal origins of adult disease-report of the First International Study Group, Sydney, 29-30 October 1994. *Placenta* 1995;16:317-20.
- [8] Langley-Evans SC. Developmental programming of health and disease. *Proc Nutr Soc* 2006;65:97-105.
- [9] Carpinello OJ, DeCherney AH, Hill MJ. Developmental origins of health and disease: the history of the barker hypothesis and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med* 2018;36:177-82.
- [10] Barker DJ. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 2004;58:114-5.
- [11] Agouademos M, Reinking BE, Koppenhafer SL, Segar JL, Scholz TD. Programming of adult cardiovascular disease following exposure to late-gestation hyperglycemia. *Neonatology* 2011;100:198-205.
- [12] Burdige GC, Hanson MA, Slater-Jefferies Jo L, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 2007;97:1038-46.
- [13] Plagemann A, Harder T, Schellong K, Schul BS, Stupin JH. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26:641-53.
- [14] Hoffman DJ, Powell TL, Barrett ES, Hardy DB. Developmental origins of metabolic diseases. *Physiol Rev* 2021;101:739-95.
- [15] Jones A, Charakida M, Falaschetti E, et al. Adipose and height growth through childhood and blood pressure status in a large prospective cohort study. *Hypertension* 2012;59:919-25.

2

Pour citer cet article : Rigal E, et al. Sommes-nous programmés dès les premiers jours à développer des maladies cardiovasculaires ? *Arch Mal Coeur Vaiss Prat* (2023), <https://doi.org/10.1016/j.amcp.2023.09.012>

Sommes-nous programmés dès les premiers jours à développer des maladies cardiovasculaires ?

- | | | | |
|-----|--|--|-----|
| 175 | [16] Singhal A, Cole TJ, Fewtrell M, et al. Promotion of faster weight gain in infants born small for gestational age: is there an adverse effect on later blood pressure? <i>Circulation</i> 2007;115:213-20. | | |
| 176 | | | |
| 177 | | | |
| 178 | | | |
| 179 | [17] Parra-Vargas M, Ramon-Krauel M, Lerin C, Jimenez-Chillaron JC. Size does matter: litter size strongly determines adult metabolism in rodents. <i>Cell Metab</i> 2020;32:334-40. | | |
| 180 | | | |
| 181 | | | |
| 182 | [18] Josse M, Rigal E, Rosenblatt-Velin N, et al. Programming of cardiovascular dysfunction by postnatal overfeeding in rodents. <i>Int J Mol Sci</i> 2020;21:9427. | | |
| 183 | | | |
| 184 | | | |
| 185 | [19] Habbout A, Guenancia C, Lorin J, et al. Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters. <i>PLoS One</i> 2013;8:e56981. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056981 . | | |
| 186 | | | |
| 187 | | | |
| 188 | | | |
| 189 | | | |
| 190 | | | |
| | | [20] Habbout A, Delemasure S, Goirand F, et al. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. <i>Biochimie</i> 2012;94:117-24. | 190 |
| | | | 191 |
| | | | 192 |
| | | [21] Li N, Guenancia C, Rigal E, et al. Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice. <i>Sci Rep</i> 2016;6:30817. | 193 |
| | | | 194 |
| | | | 195 |
| | | | 196 |
| | | [22] Zlobine I, Gopal K, Ussher JR. Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction. <i>Biochim Biophys Acta</i> 2016;1861:1555-68. | 197 |
| | | | 198 |
| | | | 199 |
| | | [23] Carvalho AB, de Carvalho AC. Heart regeneration: past, present and future. <i>World J Cardiol</i> 2010;2:107-11. | 200 |
| | | | 201 |
| | | [24] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. <i>Science</i> 2011;331:1078-80. | 202 |
| | | | 203 |
| | | | 204 |
| | | | 206 |

Interplay between efferocytosis and atherosclerosis. Rochette L, Dogon G, **Rigal E**, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. *Arch Cardiovasc Dis*. 2023 Aug 18;S1875-2136(23)00150-X. doi: 10.1016/j.acvd.2023.07.007. Online ahead of print. PMID: 37659915 Review.

GDF15: A modulator of immunity and a predictive biomarker of cardiovascular events: A strategy in COVID-19. Rochette L, Dogon G, **Rigal E**, Zeller M, Vergely C, Cottin Y. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2023 Feb;72(1):41-43. doi: 10.1016/j.ancard.2022.09.001. Epub 2022 Sep 16. PMID: 36163282

Growth differentiation factor 11: A proangiogenic drug as a potential antiaging regulating molecule. Rochette L, Dogon G, **Rigal E**, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. *Arch Cardiovasc Dis*. 2023 Jan;116(1):41-46. doi: 10.1016/j.acvd. 2022.09.006. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36572608 Review.

Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. Rochette L, Dogon G, **Rigal E**, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. *Int J Mol Sci*. 2022 Dec 27;24(1):449. doi: 10.3390/ijms24010449.

Involvement of Oxidative Stress in Protective Cardiac Functions of Calprotectin. Rochette L, Dogon G, **Rigal E**, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. *Cells*. 2022 Apr 5;11(7):1226.

Mitochondrial-derived peptides: New markers for cardiometabolic dysfunction. Rochette L, **Rigal E**, Dogon G, Malka G, Zeller M, Vergely C, Cottin Y. *Arch Cardiovasc Dis*. 2022 Jan;115(1):48-56.

Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents. Josse M, **Rigal E**, Rosenblatt-Velin N, Rochette L, Zeller M, Guenancia C, Vergely C. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 11;21(24):9427.

The Role of Osteoprotegerin in Vascular Calcification and Bone Metabolism: The Basis for Developing New Therapeutics. Rochette L, Meloux A, **Rigal E**, Zeller M, Malka G, Cottin Y, Vergely C. *Calcif Tissue Int*. 2019 Sep;105(3):239-251.

Calorie Restriction in Adulthood Reduces Hepatic Disorders Induced by Transient Postnatal Overfeeding in Mice. Zydorczyk C, Li N, **Rigal E**, Chehade H, Mosig D, Armengaud JB, Rolle T,

Krishnasamy A, Orozco E, Siddeek B, Juvet C, Vergely C, Simeoni U. *Nutrients*. 2019 Nov 16;11(11):2796.

The Role of Osteoprotegerin and Its Ligands in Vascular Function. Rochette L, Meloux A, **Rigal E**, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 6;20(3):705.

Regenerative Capacity of Endogenous Factor: Growth Differentiation Factor 11; a New Approach of the Management of Age-Related Cardiovascular Events. Rochette L, Meloux A, **Rigal E**, Zeller M, Cottin Y, Malka G, Vergely C. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 12;19(12):3998.

Ischemic Stroke Increases Heart Vulnerability to Ischemia-Reperfusion and Alters Myocardial Cardioprotective Pathways. Meloux A, **Rigal E**, Rochette L, Cottin Y, Bejot Y, Vergely C. *Stroke*. 2018 Nov;49(11):2752-2760.

The role of osteoprotegerin in the crosstalk between vessels and bone: Its potential utility as a marker of cardiometabolic diseases. Rochette L, Meloux A, **Rigal E**, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. *Pharmacol Ther*. 2018 Feb;182:115-132.

Overweight in mice, induced by perinatal programming, exacerbates doxorubicin and trastuzumab cardiotoxicity. Guenancia C, Hachet O, Aboutabl M, Li N, **Rigal E**, Cottin Y, Rochette L, Vergely C. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Apr;77(4):777-85.

Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice. Li N, Guenancia C, **Rigal E**, Hachet O, Chollet P, Desmoulins L, Leloup C, Rochette L, Vergely C. *Sci Rep*. 2016 Jul 28;6:30817.

Paradoxically, iron overload does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro in cardiomyocytes and in vivo in mice. Guenancia C, Li N, Hachet O, **Rigal E**, Cottin Y, Dutartre P, Rochette L, Vergely C. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Apr 15;284(2):152-62.

Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters. Habbout A, Guenancia C, Lorin J, **Rigal E**, Fassot C, Rochette L, Vergely C. *PLoS One*. 2013;8(2):e56981.

1/ Communications orales :

Long-term impact of postnatal nutritional programming on cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion injury *in vivo* and on cardio-protective pathways in mice. Eve RIGAL, Camille GRECO, Ivan PORCHEROT, Alexandre MELOUX, Luc ROCHETTE and Catherine VERGELY (Cardiovascular Meeting, Fribourg, Février **2019**). Présentation en anglaise.

Long-term impact of postnatal nutritional programming on cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion injury *in vivo* and on cardio-protective pathways in mice. Eve RIGAL, Camille GRECO, Ivan PORCHEROT, Alexandre MELOUX, Luc ROCHETTE and Catherine VERGELY (Printemps de la Cardiologie, Lille, Avril **2019**).

Postnatal overfeeding induces higher cardiac sensitivity to *in vivo* ischemia-reperfusion injury at all ages in males, but only in young females. Eve RIGAL, Ivan PORCHEROT, Marie JOSSE, Luc ROCHETTE and Catherine VERGELY (Cardiovascular Meeting, Fribourg, online communication orale, Juin **2021**).

Long-term impact of postnatal overfeeding on cardiometabolism risk and on sensitivity to ischemia-reperfusion injury *in vivo*. Eve RIGAL, Marie JOSSE, Geoffrey DOGON, Ivan PORCHEROT, Luc ROCHETTE, Charles GUENANCIA and Catherine VERGELY (Forum des jeunes chercheurs, Dijon, Juin **2022**). **Prix meilleure communication orale de la session.**

Long-term impact of postnatal overfeeding on cardio-metabolism risk and on sensitivity to ischemia-reperfusion injury *in vivo*. Eve RIGAL, Marie JOSSE, Geoffrey DOGON, Ivan PORCHEROT, Luc ROCHETTE, Charles GUENANCIA and Catherine VERGELY (Cardiovascular Research Meeting, Bern, Juillet **2022**). Présentation en Anglais.

2/ Communications affichées :

Long-term impact of postnatal nutritional programming on cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion injury *in vivo* and on cardio-protective pathways in mice. Eve RIGAL, Camille GRECO, Ivan PORCHEROT, Alexandre MELOUX, Luc ROCHETTE and Catherine VERGELY (Printemps de la Cardiologie, Lille, Avril **2019**). **Prix poster**

Sexual dimorphism in the long-term impact of postnatal nutritional programming on cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion injury in vivo. Eve RIGAL, Ivan PORCHEROT, Luc ROCHETTE and Catherine VERGELY (Printemps de la Cardiologie, e-poster, octobre **2020**).

Postnatal overfeeding induces higher cardiac sensitivity to in vivo ischemia-reperfusion injury at all ages in males, but only in young females. Eve RIGAL, Ivan PORCHEROT, Marie JOSSE, Luc ROCHETTE and Catherine VERGELY (Printemps de la Cardiologie, e-poster, Mai **2021**).

Long-term impact of postnatal overfeeding on cardio-metabolism risk and on sensitivity to ischemia-reperfusion injury in vivo. Eve RIGAL, Marie JOSSE, Geoffrey DOGON, Ivan PORCHEROT, Luc ROCHETTE, Charles GUENANCIA and Catherine VERGELY (Frontiers in Cardiovascular Biomedicine, Budapest, Avril **2022**). Présentation en Anglais.

Long-term impact of postnatal overfeeding on sensitivity to ischemia-reperfusion injury in vivo and on cardio-metabolism risk. Eve RIGAL, Marie JOSSE, Geoffrey DOGON, Ivan PORCHEROT, Luc ROCHETTE, Charles GUENANCIA and Catherine VERGELY (Printemps de la Cardiologie, short talk poster, Tours, Juin **2022**).

Long-term impact of postnatal overfeeding on cardio-metabolism risk and on sensitivity to ischemia-reperfusion injury in vivo. Eve RIGAL, Marie JOSSE, Geoffrey DOGON, Ivan PORCHEROT, Luc ROCHETTE, Charles GUENANCIA and Catherine VERGELY (Cardiovascular Research Meeting, Bern, Suisse, Juillet **2022**).

Does size matter? Focus on the impact of reducing litter size in mice on cardio-metabolic risk and cardiac sensitivity to in vivo ischemia in adulthood. Eve RIGAL, Marie JOSSE, Geoffrey DOGON, Luc ROCHETTE, Charles GUENANCIA and Catherine VERGELY (Printemps de la Cardiologie, short talk poster, Marseille, Mai **2023**).

Impact à long terme de la suralimentation postnatale sur la sensibilité aux lésions d'ischémie-reperfusion in vivo chez la souris. Eve RIGAL, Marie JOSSE, Geoffrey DOGON, Luc ROCHETTE, Charles GUENANCIA and Catherine VERGELY (AFSTALL, Bordeaux, Juin **2023**).

3/ Remerciements :

Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. Habbout A, Delemasure S, Goirand F, Guillard JC, Chabod F, Sediki M, Rochette L, Vergely C. *Biochimie*. 2012 ; 94 : 117-124.

4/ Enseignements réalisés :

2022-2023 : tutrice d'un groupe de trois étudiants de master 1 Biologie Santé (UFR Sciences, Vie, Terre et Environnement) dans la mise en place d'une séance de TP (pour 15 étudiant.e.s d'environ 4h) illustrant les résultats de plusieurs expériences réalisées dans le cadre d'un travail de recherche expérimentale. Accompagnement de 8h (8 séances d'une heure par semaine).

Travaux dirigés (TD=12h) et pratiques (TP = 24h) de biochimie « Techniques en Biochimie et Biologie Moléculaire » (TBBM), aux étudiants de licence 2 au sein de l'UFR SVTE. Section CNU : 64.

2021-2022 : Travaux dirigés (TD=24h) et pratiques (TP=24h) de biochimie « Techniques en Biochimie et Biologie Moléculaire » (TBBM), aux étudiants de licence 2 au sein de l'UFR SVTE. Section CNU : 64.

2020-2021 : Travaux dirigés (TD=36h) et pratiques (TP=14h) de biochimie « Techniques en Biochimie et Biologie Moléculaire » (TBBM) aux étudiants de licence 2 au sein de l'UFR SVTE. Section CNU : 64.

2019-2020 : Travaux pratiques (TP=36h) de physiologie animale et thermodynamique et travaux pratiques (TP=32h) de biochimie « Techniques en Biochimie et Biologie Moléculaire » (TBBM). Section CNU 66 et 64.

BIBLIOGRAPHIE

1. Balakrishnan, V.S., *Europe's obesity burden on the rise: WHO report*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2022. **10**(7): p. 488.
2. Boutari, C. and C.S. Mantzoros, *A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on*. Metabolism, 2022. **133**: p. 155217.
3. Schetz, M., et al., *Obesity in the critically ill: a narrative review*. Intensive Care Med, 2019. **45**(6): p. 757-769.
4. Lavie, C.J., R.V. Milani, and H.O. Ventura, *Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(21): p. 1925-32.
5. Litwin, S.E., *Which measures of obesity best predict cardiovascular risk?* J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(8): p. 616-9.
6. Pischon, T., et al., *General and abdominal adiposity and risk of death in Europe*. N Engl J Med, 2008. **359**(20): p. 2105-20.
7. Luppino, F.S., et al., *Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies*. Arch Gen Psychiatry, 2010. **67**(3): p. 220-9.
8. Li, C., et al., *Prevalence of self-reported clinically diagnosed sleep apnea according to obesity status in men and women: National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2006*. Prev Med, 2010. **51**(1): p. 18-23.
9. Bello-Chavolla, O.Y., et al., *Predicting Mortality Due to SARS-CoV-2: A Mechanistic Score Relating Obesity and Diabetes to COVID-19 Outcomes in Mexico*. J Clin Endocrinol Metab, 2020. **105**(8).
10. Church, T.S., et al., *Association of cardiorespiratory fitness, body mass index, and waist circumference to nonalcoholic fatty liver disease*. Gastroenterology, 2006. **130**(7): p. 2023-30.
11. Guh, D.P., et al., *The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis*. BMC Public Health, 2009. **9**: p. 88.
12. Lauby-Secretan, B., et al., *Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group*. N Engl J Med, 2016. **375**(8): p. 794-8.
13. Mechanick, J.I., et al., *American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery Medical Guidelines for Clinical Practice for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient*. Surg Obes Relat Dis, 2008. **4**(5 Suppl): p. S109-84.
14. Bouchard, C., *The causes of obesity: advances in molecular biology but stagnation on the genetic front*. Diabetologia, 1996. **39**(12): p. 1532-3.
15. Speliotes, E.K., et al., *Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index*. Nat Genet, 2010. **42**(11): p. 937-48.
16. Hindorff, L.A., et al., *Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9362-7.
17. Neel, J.V., *Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?* Am J Hum Genet, 1962. **14**(4): p. 353-62.
18. Mokdad, A.H., et al., *Actual causes of death in the United States, 2000*. JAMA, 2004. **291**(10): p. 1238-45.
19. Wadden, T.A., et al., *Lifestyle modification for obesity: new developments in diet, physical activity, and behavior therapy*. Circulation, 2012. **125**(9): p. 1157-70.
20. Malik, V.S., et al., *Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk*. Circulation, 2010. **121**(11): p. 1356-64.
21. Correia, J.C., et al., *[The role of stress in obesity]*. Rev Med Suisse, 2021. **17**(731): p. 567-570.
22. Hruby, A. and F.B. Hu, *The Epidemiology of Obesity: A Big Picture*. Pharmacoeconomics, 2015. **33**(7): p. 673-89.
23. Elmquist, J.K., C.F. Elias, and C.B. Saper, *From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight*. Neuron, 1999. **22**(2): p. 221-32.

24. Salem, V. and W.S. Dhillon, *IMAGING IN ENDOCRINOLOGY: The use of functional MRI to study the endocrinology of appetite*. Eur J Endocrinol, 2015. **173**(2): p. R59-68.
25. Gjermani, E., et al., *Obesity-An Update on the Basic Pathophysiology and Review of Recent Therapeutic Advances*. Biomolecules, 2021. **11**(10).
26. Yoo, E.S., J. Yu, and J.W. Sohn, *Neuroendocrine control of appetite and metabolism*. Exp Mol Med, 2021. **53**(4): p. 505-516.
27. Matafome, P., et al., *Neuroendocrinology of Adipose Tissue and Gut-Brain Axis*. Adv Neurobiol, 2017. **19**: p. 49-70.
28. Yang, J., et al., *Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone*. Cell, 2008. **132**(3): p. 387-96.
29. Carrel, G. and V. Giusti, *[Food intake: not only a question of will!]*. Rev Med Suisse, 2009. **5**(198): p. 769-72.
30. Boswell, T. and I.C. Dunn, *Regulation of Agouti-Related Protein and Pro-Opiomelanocortin Gene Expression in the Avian Arcuate Nucleus*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 75.
31. Apovian, C.M., *Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden*. Am J Manag Care, 2016. **22**(7 Suppl): p. s176-85.
32. Oken, E., et al., *Gestational weight gain and child adiposity at age 3 years*. Am J Obstet Gynecol, 2007. **196**(4): p. 322 e1-8.
33. Gillman, M.W., et al., *Developmental origins of childhood overweight: potential public health impact*. Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(7): p. 1651-6.
34. Armitage, J.A., et al., *Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals?* J Physiol, 2004. **561**(Pt 2): p. 355-77.
35. Vickers, M.H., S.O. Krechowec, and B.H. Breier, *Is later obesity programmed in utero?* Curr Drug Targets, 2007. **8**(8): p. 923-34.
36. Howie, G.J., et al., *Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 4): p. 905-15.
37. Hutley, L. and J.B. Prins, *Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome*. Am J Med Sci, 2005. **330**(6): p. 280-9.
38. Galili, O., et al., *Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(2): p. H904-11.
39. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(4): p. 332-41.
40. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.
41. Arnal, J.F., et al., *[Usefulness of experimental models to understand the vascular effects of estrogens]*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(12): p. 1226-32.
42. Hou, P., et al., *Macrophage polarization and metabolism in atherosclerosis*. Cell Death Dis, 2023. **14**(10): p. 691.
43. Gimbrone, M.A., Jr. and G. Garcia-Cardena, *Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 620-36.
44. Tedgui, A., *The role of inflammation in atherothrombosis: implications for clinical practice*. Vasc Med, 2005. **10**(1): p. 45-53.
45. Gach, O., H.Z. El, and P. Lancellotti, *[Acute coronary syndrome]*. Rev Med Liege, 2018. **73**(5-6): p. 243-250.
46. de Simone, G., et al., *Association of left ventricular hypertrophy with metabolic risk factors: the HyperGEN study*. J Hypertens, 2002. **20**(2): p. 323-31.
47. Rider, O.J., et al., *Ventricular hypertrophy and cavity dilatation in relation to body mass index in women with uncomplicated obesity*. Heart, 2011. **97**(3): p. 203-8.
48. Haass, M., et al., *Body mass index and adverse cardiovascular outcomes in heart failure patients with preserved ejection fraction: results from the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial*. Circ Heart Fail, 2011. **4**(3): p. 324-31.

49. Snipelisky, D., S.P. Chaudhry, and G.C. Stewart, *The Many Faces of Heart Failure*. Card Electrophysiol Clin, 2019. **11**(1): p. 11-20.
50. Kenchaiah, S., et al., *Obesity and the risk of heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(5): p. 305-13.
51. Klein, S., et al., *Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation*. Circulation, 2004. **110**(18): p. 2952-67.
52. Alpert, M.A., *Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome*. Am J Med Sci, 2001. **321**(4): p. 225-36.
53. Bharati, S. and M. Lev, *Cardiac conduction system involvement in sudden death of obese young people*. Am Heart J, 1995. **129**(2): p. 273-81.
54. Anderson, K.P., *Sudden death, hypertension, and hypertrophy*. J Cardiovasc Pharmacol, 1984. **6 Suppl 3**: p. S498-503.
55. Denke, M.A., C.T. Sempos, and S.M. Grundy, *Excess body weight. An underrecognized contributor to high blood cholesterol levels in white American men*. Arch Intern Med, 1993. **153**(9): p. 1093-103.
56. Lamon-Fava, S., P.W. Wilson, and E.J. Schaefer, *Impact of body mass index on coronary heart disease risk factors in men and women. The Framingham Offspring Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(12): p. 1509-15.
57. Pou, K.M., et al., *Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2007. **116**(11): p. 1234-41.
58. Emerging Risk Factors, C., et al., *Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease*. JAMA, 2009. **302**(18): p. 1993-2000.
59. Kastelein, J.J., et al., *Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment*. Circulation, 2008. **117**(23): p. 3002-9.
60. Marsh, J.B., *Lipoprotein metabolism in obesity and diabetes: insights from stable isotope kinetic studies in humans*. Nutr Rev, 2003. **61**(11): p. 363-75.
61. Field, A.E., et al., *Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period*. Arch Intern Med, 2001. **161**(13): p. 1581-6.
62. Mokdad, A.H., et al., *Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998*. Diabetes Care, 2000. **23**(9): p. 1278-83.
63. Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 1093-129.
64. Bertrand, L., et al., *Insulin signalling in the heart*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(2): p. 238-48.
65. Young, M.E., P. McNulty, and H. Taegtmeyer, *Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms*. Circulation, 2002. **105**(15): p. 1861-70.
66. Abel, E.D., K.M. O'Shea, and R. Ramasamy, *Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2068-76.
67. Zlobine, I., K. Gopal, and J.R. Ussher, *Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1861**(10): p. 1555-68.
68. Sinenko, S.A., et al., *Physiological Signaling Functions of Reactive Oxygen Species in Stem Cells: From Flies to Man*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 714370.
69. Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar, *Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(1): p. 30-8.
70. Yu, C., et al., *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50230-6.
71. Kahn, B.B., *Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes*. J Clin Invest, 1992. **89**(5): p. 1367-74.
72. Shulman, G.I., *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 171-6.

73. Hubbard, S.R., *Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog*. EMBO J, 1997. **16**(18): p. 5572-81.
74. Du, X.L., et al., *Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1341-8.
75. Fève, *Dysfonction endothéliale au cours du diabète : déséquilibre des voies de signalisation et implication du stress oxydatif*. Médecine des Maladies Métaboliques, 2008. **2**: p. 198-203.
76. Danaei, G., et al., *National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants*. Lancet, 2011. **378**(9785): p. 31-40.
77. Aneja, A., et al., *Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options*. Am J Med, 2008. **121**(9): p. 748-57.
78. MacDonald, M.R., et al., *Discordant short- and long-term outcomes associated with diabetes in patients with heart failure: importance of age and sex: a population study of 5.1 million people in Scotland*. Circ Heart Fail, 2008. **1**(4): p. 234-41.
79. Andersen, G.O., et al., *Activin A levels are associated with abnormal glucose regulation in patients with myocardial infarction: potential counteracting effects of activin A on inflammation*. Diabetes, 2011. **60**(5): p. 1544-51.
80. Bartnik, M., A. Norhammar, and L. Ryden, *Hyperglycaemia and cardiovascular disease*. J Intern Med, 2007. **262**(2): p. 145-56.
81. Wong, C.Y., et al., *Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity*. Circulation, 2004. **110**(19): p. 3081-7.
82. Al-Dibouni, A., et al., *Unique Genetic and Histological Signatures of Mouse Pericardial Adipose Tissue*. Nutrients, 2020. **12**(6).
83. Ades, P.A. and P.D. Savage, *The obesity paradox: perception vs knowledge*. Mayo Clin Proc, 2010. **85**(2): p. 112-4.
84. Arena, R. and C.J. Lavie, *The obesity paradox and outcome in heart failure: is excess bodyweight truly protective?* Future Cardiol, 2010. **6**(1): p. 1-6.
85. Uretsky, S., et al., *Obesity paradox in patients with hypertension and coronary artery disease*. Am J Med, 2007. **120**(10): p. 863-70.
86. Lavie, C.J., R.V. Milani, and H.O. Ventura, *Obesity, heart disease, and favorable prognosis--truth or paradox?* Am J Med, 2007. **120**(10): p. 825-6.
87. De Schutter, A., C.J. Lavie, and R.V. Milani, *The impact of obesity on risk factors and prevalence and prognosis of coronary heart disease--the obesity paradox*. Prog Cardiovasc Dis, 2014. **56**(4): p. 401-8.
88. Correia, F.G.S., et al., *Night work is related to higher global and central adiposity in Brazil: National Health Survey, 2013*. Am J Ind Med, 2020. **63**(1): p. 85-91.
89. Liu, Y.S., et al., *Carbohydrate intake and risk of metabolic syndrome: A dose-response meta-analysis of observational studies*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2019. **29**(12): p. 1288-1298.
90. Martinez-Gomez, D., et al., *Physical Activity and Risk of Metabolic Phenotypes of Obesity: A Prospective Taiwanese Cohort Study in More Than 200,000 Adults*. Mayo Clin Proc, 2019. **94**(11): p. 2209-2219.
91. Myers, J., P. Kokkinos, and E. Nyelin, *Physical Activity, Cardiorespiratory Fitness, and the Metabolic Syndrome*. Nutrients, 2019. **11**(7).
92. Vassallo, P., S.L. Driver, and N.J. Stone, *Metabolic Syndrome: An Evolving Clinical Construct*. Prog Cardiovasc Dis, 2016. **59**(2): p. 172-177.
93. Silveira Rossi, J.L., et al., *Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Going beyond traditional risk factors*. Diabetes Metab Res Rev, 2022. **38**(3): p. e3502.
94. Parsanathan, R. and S.K. Jain, *Novel Invasive and Noninvasive Cardiac-Specific Biomarkers in Obesity and Cardiovascular Diseases*. Metab Syndr Relat Disord, 2020. **18**(1): p. 10-30.
95. Charles, M.A., et al., *Risk factors for NIDDM in white population. Paris prospective study*. Diabetes, 1991. **40**(7): p. 796-9.

96. Miller, W.L. and R.J. Auchus, *The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders*. *Endocr Rev*, 2011. **32**(1): p. 81-151.
97. Holm, P., *Effect of estrogen on development of atherosclerosis. A review of experimental animal studies*. *Dan Med Bull*, 2001. **48**(3): p. 146-60.
98. Ventura-Clapier, R., et al., *Sex in basic research: concepts in the cardiovascular field*. *Cardiovasc Res*, 2017. **113**(7): p. 711-724.
99. Nwankwo, T., et al., *Hypertension among adults in the United States: National Health and Nutrition Examination Survey, 2011-2012*. *NCHS Data Brief*, 2013(133): p. 1-8.
100. Hodgin, J.B. and N. Maeda, *Minireview: estrogen and mouse models of atherosclerosis*. *Endocrinology*, 2002. **143**(12): p. 4495-501.
101. Gisclard, V., V.M. Miller, and P.M. Vanhoutte, *Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988. **244**(1): p. 19-22.
102. Le Romancer, M., et al., *Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1*. *Mol Cell*, 2008. **31**(2): p. 212-21.
103. Liu, H., et al., *Mitochondrial p38beta and manganese superoxide dismutase interaction mediated by estrogen in cardiomyocytes*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e85272.
104. Camper-Kirby, D., et al., *Myocardial Akt activation and gender: increased nuclear activity in females versus males*. *Circ Res*, 2001. **88**(10): p. 1020-7.
105. Chen, C., et al., *Apoptosis and autophagy contribute to gender difference in cardiac ischemia-reperfusion induced injury in rats*. *Life Sci*, 2013. **93**(7): p. 265-70.
106. Mahmoodzadeh, S., et al., *Cardiomyocyte-specific Estrogen Receptor Alpha Increases Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Reduces Fibrosis in the Female Mouse Heart Post-Myocardial Infarction*. *J Cell Sci Ther*, 2014. **5**(1): p. 153.
107. Fourny, N., et al., *Sex Differences of the Diabetic Heart*. *Front Physiol*, 2021. **12**: p. 661297.
108. Rao, P.M., D.M. Kelly, and T.H. Jones, *Testosterone and insulin resistance in the metabolic syndrome and T2DM in men*. *Nat Rev Endocrinol*, 2013. **9**(8): p. 479-93.
109. Group, E.U.C.C.S., et al., *Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(1): p. 24-34.
110. Sattar, N., *Gender aspects in type 2 diabetes mellitus and cardiometabolic risk*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2013. **27**(4): p. 501-7.
111. Tabak, A.G., et al., *Prediabetes: a high-risk state for diabetes development*. *Lancet*, 2012. **379**(9833): p. 2279-90.
112. Chait, A. and L.J. den Hartigh, *Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease*. *Front Cardiovasc Med*, 2020. **7**: p. 22.
113. Scheja, L. and J. Heeren, *The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease*. *Nat Rev Endocrinol*, 2019. **15**(9): p. 507-524.
114. Rajapurohitam, V., et al., *The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes*. *Circ Res*, 2003. **93**(4): p. 277-9.
115. Shibata, R., et al., *Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart*. *Nat Med*, 2004. **10**(12): p. 1384-9.
116. Ohashi, K., et al., *Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension*. *Hypertension*, 2006. **47**(6): p. 1108-16.
117. Genoux, A., J.P. Bastard, and R.A. groupe de travail, *[Effects of leptin and adiponectin on the cardiovascular system]*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2020. **78**(3): p. 253-260.
118. Spiegelman, B.M. and J.S. Flier, *Obesity and the regulation of energy balance*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 531-43.
119. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(1): p. 277-359.
120. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(15): p. 1509-17.

121. Cypess, A.M., et al., *Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 635-9.
122. Kahn, C.R., G. Wang, and K.Y. Lee, *Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2019. **129**(10): p. 3990-4000.
123. Hany, T.F., et al., *Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2002. **29**(10): p. 1393-8.
124. Lee, M.W., M. Lee, and K.J. Oh, *Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs*. J Clin Med, 2019. **8**(6).
125. Walden, T.B., et al., *Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(1): p. E19-31.
126. Wu, J., et al., *Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human*. Cell, 2012. **150**(2): p. 366-76.
127. Shao, M., et al., *Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited*. Diabetes, 2019. **68**(10): p. 1874-1885.
128. Shinoda, K., et al., *Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes*. Nat Med, 2015. **21**(4): p. 389-94.
129. Antonopoulos, A.S., et al., *Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat*. Sci Transl Med, 2017. **9**(398).
130. Antonopoulos, A.S. and C. Antoniades, *The role of epicardial adipose tissue in cardiac biology: classic concepts and emerging roles*. J Physiol, 2017. **595**(12): p. 3907-3917.
131. Antonopoulos, A.S., et al., *Mutual Regulation of Epicardial Adipose Tissue and Myocardial Redox State by PPAR-gamma/Adiponectin Signalling*. Circ Res, 2016. **118**(5): p. 842-55.
132. Antonopoulos, A.S., et al., *Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue*. Diabetes, 2015. **64**(6): p. 2207-19.
133. Margaritis, M., et al., *Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels*. Circulation, 2013. **127**(22): p. 2209-21.
134. Rossi, V.A., et al., *The Different Pathways of Epicardial Adipose Tissue across the Heart Failure Phenotypes: From Pathophysiology to Therapeutic Target*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(7).
135. Iacobellis, G., *Local and systemic effects of the multifaceted epicardial adipose tissue depot*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(6): p. 363-71.
136. Fitzgibbons, T.P. and M.P. Czech, *Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(2): p. e000582.
137. Venteclef, N., et al., *Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinines*. Eur Heart J, 2015. **36**(13): p. 795-805a.
138. Blumensatt, M., et al., *Activin A impairs insulin action in cardiomyocytes via up-regulation of miR-143*. Cardiovasc Res, 2013. **100**(2): p. 201-10.
139. Greulich, S., et al., *Secretory products from epicardial adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus induce cardiomyocyte dysfunction*. Circulation, 2012. **126**(19): p. 2324-34.
140. Roh, J.D., et al., *Activin type II receptor signaling in cardiac aging and heart failure*. Sci Transl Med, 2019. **11**(482).
141. Cherian, S., G.D. Lopaschuk, and E. Carvalho, *Cellular cross-talk between epicardial adipose tissue and myocardium in relation to the pathogenesis of cardiovascular disease*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **303**(8): p. E937-49.
142. Aslanabadi, N., et al., *Epicardial and pericardial fat volume correlate with the severity of coronary artery stenosis*. J Cardiovasc Thorac Res, 2014. **6**(4): p. 235-9.
143. Kenchaiah, S., et al., *Pericardial Fat and the Risk of Heart Failure*. J Am Coll Cardiol, 2021. **77**(21): p. 2638-2652.
144. Hu, J., et al., *Activin A stimulates the proliferation and differentiation of cardiac fibroblasts via the ERK1/2 and p38-MAPK pathways*. Eur J Pharmacol, 2016. **789**: p. 319-327.

145. Barker, D.J., *The fetal and infant origins of adult disease*. BMJ, 1990. **301**(6761): p. 1111.
146. Barker, D.J., *Fetal origins of coronary heart disease*. BMJ, 1995. **311**(6998): p. 171-4.
147. Hales, C.N., et al., *Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64*. BMJ, 1991. **303**(6809): p. 1019-22.
148. Barker, D.J., et al., *Weight in infancy and death from ischaemic heart disease*. Lancet, 1989. **2**(8663): p. 577-80.
149. Barker, D.J., et al., *Growth in utero and blood pressure levels in the next generation*. J Hypertens, 2000. **18**(7): p. 843-6.
150. Mitanchez, D., A. Burguet, and U. Simeoni, *Infants born to mothers with gestational diabetes mellitus: mild neonatal effects, a long-term threat to global health*. J Pediatr, 2014. **164**(3): p. 445-50.
151. Barker, D.J., P.D. Gluckman, and J.S. Robinson, *Conference report: fetal origins of adult disease--report of the First International Study Group, Sydney, 29-30 October 1994*. Placenta, 1995. **16**(3): p. 317-20.
152. Langley-Evans, S.C., *Developmental programming of health and disease*. Proc Nutr Soc, 2006. **65**(1): p. 97-105.
153. Carpinello, O.J., A.H. DeCherney, and M.J. Hill, *Developmental Origins of Health and Disease: The History of the Barker Hypothesis and Assisted Reproductive Technology*. Semin Reprod Med, 2018. **36**(3-04): p. 177-182.
154. Barker, D.J., *Developmental origins of adult health and disease*. J Epidemiol Community Health, 2004. **58**(2): p. 114-5.
155. Agoudemos, M., et al., *Programming of adult cardiovascular disease following exposure to late-gestation hyperglycemia*. Neonatology, 2011. **100**(2): p. 198-205.
156. Boullu-Ciocca, S., et al., *Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome*. Diabetes, 2005. **54**(1): p. 197-203.
157. Plagemann, A., et al., *Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats*. Brain Res, 1999. **836**(1-2): p. 146-55.
158. Kennedy, G.C., *The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat*. J Endocrinol, 1957. **16**(1): p. 9-17.
159. Barker, D.J., et al., *Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life*. BMJ, 1990. **301**(6746): p. 259-62.
160. Loche, E., et al., *Maternal diet-induced obesity programmes cardiac dysfunction in male mice independently of post-weaning diet*. Cardiovasc Res, 2018. **114**(10): p. 1372-1384.
161. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences*. J Nutr, 2013. **143**(5): p. 553-62.
162. Junior, M.D.F., et al., *Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats*. Life Sci, 2019. **226**: p. 173-184.
163. Yim, H.E., et al., *Overweight, hypertension and renal dysfunction in adulthood of neonatally overfed rats*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(7): p. 1324-33.
164. Manrique, C., G. Lastra, and J.R. Sowers, *New insights into insulin action and resistance in the vasculature*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**(1): p. 138-50.
165. Sanchez-Garcia, G., L. Del Bosque-Plata, and E. Hong, *Postnatal overnutrition affects metabolic and vascular function reflected by physiological and histological changes in the aorta of adult Wistar rats*. Clin Exp Hypertens, 2018. **40**(5): p. 452-460.
166. Achard, V., et al., *Immediate Postnatal Overfeeding in Rats Programs Aortic Wall Structure Alterations and Metalloproteinases Dysregulation in Adulthood*. Am J Hypertens, 2016. **29**(6): p. 719-26.
167. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56981.

168. Li, N., et al., *Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 30817.
169. Vieira, A.K., et al., *Overnourishment during lactation induces metabolic and haemodynamic heart impairment during adulthood*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2015. **25**(11): p. 1062-9.
170. Velkoska, E., et al., *Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats*. *J Nutr*, 2008. **138**(9): p. 1622-7.
171. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood*. *Biochimie*, 2012. **94**(1): p. 117-24.
172. Dorner, G., N. Hagen, and W. Witthuhn, [*Early postnatal overfeeding as an etiopathogenetic factor in adult obesity*]. *Acta Biol Med Ger*, 1976. **35**(6): p. 799-803.
173. Souza, L.L., E.G. Moura, and P.C. Lisboa, *Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring*. *Nutrients*, 2022. **14**(10).
174. McCrory, C. and R. Layte, *Breastfeeding and risk of overweight and obesity at nine-years of age*. *Soc Sci Med*, 2012. **75**(2): p. 323-30.
175. Ma, J., et al., *Breastfeeding and childhood obesity: A 12-country study*. *Matern Child Nutr*, 2020. **16**(3): p. e12984.
176. Rudnicka, A.R., C.G. Owen, and D.P. Strachan, *The effect of breastfeeding on cardiorespiratory risk factors in adult life*. *Pediatrics*, 2007. **119**(5): p. e1107-15.
177. von Kries, R., et al., *Breast feeding and obesity: cross sectional study*. *BMJ*, 1999. **319**(7203): p. 147-50.
178. Martin, C.R., P.R. Ling, and G.L. Blackburn, *Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula*. *Nutrients*, 2016. **8**(5).
179. Cunha, A.C., et al., *Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2*. *J Nutr Biochem*, 2009. **20**(6): p. 435-42.
180. Moreira, A.S., et al., *Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009. **19**(11): p. 805-10.
181. Sefcikova, Z., et al., *Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests*. *Physiol Res*, 2011. **60**(2): p. 337-46.
182. Plagemann, A., et al., *Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 20): p. 4963-76.
183. Plagemann, A., *Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake*. *Horm Res*, 2006. **65 Suppl 3**: p. 83-9.
184. Li, G., et al., *Early postnatal nutrition determines adult physical activity and energy expenditure in female mice*. *Diabetes*, 2013. **62**(8): p. 2773-83.
185. Plagemann, A., et al., *Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats*. *Brain Res*, 1999. **818**(1): p. 160-3.
186. Lopez, M., et al., *A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat*. *Diabetologia*, 2005. **48**(1): p. 140-8.
187. Meister, B., *Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus*. *Vitam Horm*, 2000. **59**: p. 265-304.
188. Kappeler, L., et al., *Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice*. *Endocrinology*, 2009. **150**(1): p. 314-23.
189. Ye, Z., et al., *Obesity induced by neonatal overfeeding worsens airway hyperresponsiveness and inflammation*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47013.
190. Velkoska, E., T.J. Cole, and M.J. Morris, *Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **288**(6): p. E1236-43.

191. Rodrigues, A.L., et al., *Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(2): p. 109-17.
192. Boullu-Ciocca, S., et al., *Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood*. Diabetes, 2008. **57**(3): p. 669-77.
193. Bei, F., et al., *Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats*. Lipids Health Dis, 2015. **14**: p. 96.
194. Rodrigues, A.L., et al., *Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition*. J Endocrinol, 2007. **195**(3): p. 485-94.
195. Liu, H.W., et al., *Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(11): p. 1859-69.
196. Burdge, G.C., et al., *Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life?* Br J Nutr, 2007. **97**(6): p. 1036-46.
197. Marousez, L., J. Lesage, and D. Eberle, *Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming?* Nutrients, 2019. **11**(12).
198. Weber, M., *[DNA methylation, a key player in pluripotency]*. Med Sci (Paris), 2011. **27**(5): p. 483-5.
199. Olins, D.E. and A.L. Olins, *Chromatin history: our view from the bridge*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(10): p. 809-14.
200. Lacoste, N. and J. Cote, *[The epigenetic code of histones]*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(10): p. 955-9.
201. Trivedi, C.M., et al., *Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 324-31.
202. Zhang, C.L., et al., *Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy*. Cell, 2002. **110**(4): p. 479-88.
203. Kaneda, R., et al., *Genome-wide histone methylation profile for heart failure*. Genes Cells, 2009. **14**(1): p. 69-77.
204. Dautry, F. and C. Ribet, *[RNA interference: towards a functional genomics in mammalian cells?]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(8-9): p. 815-9.
205. Melchior, M., *Conséquences des perturbations périnatales sur les réponses douloureuses* Consequences of perinatal disturbances on pain responses. Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement, 2015. **16**(2): p. 77-85.
206. Painter, R.C., et al., *Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life*. BJOG, 2008. **115**(10): p. 1243-9.
207. Milagro, F.I., et al., *Dietary factors, epigenetic modifications and obesity outcomes: progresses and perspectives*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(4): p. 782-812.
208. Plagemann, A., et al., *Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012. **26**(5): p. 641-53.
209. Hoffman, D.J., et al., *Developmental origins of metabolic diseases*. Physiol Rev, 2021. **101**(3): p. 739-795.
210. Zhang, S., et al., *DNMT1-induced miR-133b suppression via methylation promotes myocardial fibrosis after myocardial infarction*. Gen Physiol Biophys, 2023. **42**(5): p. 417-429.
211. Anderson, J.L. and D.A. Morrow, *Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2017. **376**(21): p. 2053-2064.
212. Allen, D.G. and C.H. Orchard, *Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia*. Circ Res, 1987. **60**(2): p. 153-68.
213. Patel, R.D. and J.L. Saver, *Evolution of reperfusion therapies for acute brain and acute myocardial ischemia: a systematic, comparative analysis*. Stroke, 2013. **44**(1): p. 94-8.

214. Sun, H., et al., *RNA sequencing revealing the role of AMP-activated protein kinase signaling in mice myocardial ischemia reperfusion injury*. Gene, 2019. **703**: p. 91-101.
215. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
216. Rochette, L. and V. Maupoil, *[From ischemia to reperfusion lesions]*. Arch Mal Coeur Vaiss, 1993. **86 Spec No 4**: p. 13-7.
217. Villedieu, *Rôle de la SIRT3 et de la déacétylation des protéines mitochondriales dans la cardioprotection : effet du vieillissement*. 2018, Lyon.
218. Vahanian, A., *[Coronary reperfusion in acute myocardial infarction]*. Bull Acad Natl Med, 2005. **189**(2): p. 227-35; discussion 235-6.
219. Antman, E.M., et al., *ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction--executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction)*. Can J Cardiol, 2004. **20**(10): p. 977-1025.
220. Opie, L.H., *Myocardial ischemia--metabolic pathways and implications of increased glycolysis*. Cardiovasc Drugs Ther, 1990. **4 Suppl 4**: p. 777-90.
221. Manning, A.S., D.J. Coltart, and D.J. Hearse, *Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol*. Circ Res, 1984. **55**(4): p. 545-8.
222. Willerson, J.T. and L.M. Buja, *Protection of the myocardium during myocardial infarction: pharmacologic protection during thrombolytic therapy*. Am J Cardiol, 1990. **65**(19): p. 351-411.
223. Zima, A.V. and L.A. Blatter, *Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 310-21.
224. Kuster, G.M., et al., *Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(9): p. 1182-7.
225. Murphy, E. and C. Steenbergen, *What makes the mitochondria a killer? Can we condition them to be less destructive?* Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(7): p. 1302-8.
226. Crompton, M. and A. Costi, *Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload*. Eur J Biochem, 1988. **178**(2): p. 489-501.
227. Di Lisa, F. and P. Bernardi, *Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 191-9.
228. Murphy, E. and C. Steenbergen, *Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 581-609.
229. Joza, N., et al., *Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death*. Nature, 2001. **410**(6828): p. 549-54.
230. Crompton, M., *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death*. J Physiol, 2000. **529 Pt 1**(Pt 1): p. 11-21.
231. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
232. Manning, A.S. and D.J. Hearse, *Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention*. J Mol Cell Cardiol, 1984. **16**(6): p. 497-518.
233. Tennant, R., *Studies in the Pathology of Vascular disease: Studies on Experimental Coronary Occlusion*. Yale J Biol Med, 1936. **9**(1): p. 60-64 8.
234. Bolli, R. and E. Marban, *Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 609-34.
235. Chettibi, M., et al., *[No reflow: What are the predictors?]*. Ann Cardiol Angeiol (Paris), 2015. **64**(6): p. 472-80.
236. Mizote, I., et al., *Distal protection improved reperfusion and reduced left ventricular dysfunction in patients with acute myocardial infarction who had angioscopically defined ruptured plaque*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 1001-7.

237. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
238. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
239. Staat, P., et al., *Postconditioning the human heart*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
240. Kin, H., et al., *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(1): p. 74-85.
241. Hausenloy, D.J. and L. Scorrano, *Targeting cell death*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(4): p. 370-3.
242. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection*. Heart Fail Rev, 2007. **12**(3-4): p. 217-34.
243. Cross, T.G., et al., *Serine/threonine protein kinases and apoptosis*. Exp Cell Res, 2000. **256**(1): p. 34-41.
244. Balakirev, M., V.V. Khramtsov, and G. Zimmer, *Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide*. Eur J Biochem, 1997. **246**(3): p. 710-8.
245. Juhaszova, M., et al., *Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection*. Circ Res, 2009. **104**(11): p. 1240-52.
246. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
247. Davidson, S.M., et al., *Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(3): p. 414-9.
248. Hausenloy, D.J., S. Lecour, and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(5): p. 893-907.
249. Lecour, S., *Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(1): p. 32-40.
250. Lecour, S., *Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without Aktion?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(5): p. 607-9.
251. Goodman, M.D., et al., *Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(4): p. H1649-56.
252. Huet, F., et al., *Low-dose colchicine prevents sympathetic denervation after myocardial ischemia-reperfusion: a new potential protective mechanism*. Future Sci OA, 2020. **7**(2): p. FSO656.
253. Belaidi, E., et al., *Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity: its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia*. Int J Cardiol, 2016. **210**: p. 45-53.
254. Potterat, M.M., et al., *[Women, forgotten by clinical research]*. Rev Med Suisse, 2015. **11**(487): p. 1733-6.
255. Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016*. Eur Heart J, 2016. **37**(42): p. 3232-3245.
256. Savji, N., et al., *The Association of Obesity and Cardiometabolic Traits With Incident HFpEF and HFrEF*. JACC Heart Fail, 2018. **6**(8): p. 701-709.
257. Ho, J.E., et al., *Discriminating clinical features of heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in the community*. Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1734-41.
258. Redfield, M.M., et al., *Age- and gender-related ventricular-vascular stiffening: a community-based study*. Circulation, 2005. **112**(15): p. 2254-62.
259. Lieber, A., et al., *Aortic wave reflection in women and men*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(1): p. H236-42.

260. Mittwoch, U., *Blastocysts prepare for the race to be male*. Hum Reprod, 1993. **8**(10): p. 1550-5.
261. Krishnaveni, G.V., et al., *Intrauterine exposure to maternal diabetes is associated with higher adiposity and insulin resistance and clustering of cardiovascular risk markers in Indian children*. Diabetes Care, 2010. **33**(2): p. 402-4.
262. Regnault, N., et al., *Sex-specific associations of gestational glucose tolerance with childhood body composition*. Diabetes Care, 2013. **36**(10): p. 3045-53.
263. Ravelli, A.C., et al., *Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(5): p. 811-6.
264. Samuelsson, A.M., et al., *Sucrose feeding in mouse pregnancy leads to hypertension, and sex-linked obesity and insulin resistance in female offspring*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 14.
265. Kuo, A.H., et al., *Sex-dimorphic acceleration of pericardial, subcutaneous, and plasma lipid increase in offspring of poorly nourished baboons*. Int J Obes (Lond), 2018. **42**(5): p. 1092-1096.
266. Lumey, L.H., et al., *Lipid profiles in middle-aged men and women after famine exposure during gestation: the Dutch Hunger Winter Families Study*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(6): p. 1737-43.
267. Vickers, M.H., et al., *Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function*. Endocrinology, 2011. **152**(4): p. 1378-87.
268. Dearden, L. and N. Balthasar, *Sexual dimorphism in offspring glucose-sensitive hypothalamic gene expression and physiological responses to maternal high-fat diet feeding*. Endocrinology, 2014. **155**(6): p. 2144-54.
269. Blenck, C.L., et al., *The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease*. Circ Res, 2016. **118**(8): p. 1294-312.
270. Jenkins, K.J., et al., *Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics*. Circulation, 2007. **115**(23): p. 2995-3014.
271. Sun, B., et al., *Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2833-41.
272. Fox, C.S., et al., *Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study*. Circulation, 2007. **116**(1): p. 39-48.
273. Despres, J.P., et al., *Race, visceral adipose tissue, plasma lipids, and lipoprotein lipase activity in men and women: the Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics (HERITAGE) family study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(8): p. 1932-8.
274. Liu, J., et al., *Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(12): p. 5419-26.
275. Parra-Vargas, M., et al., *Size Does Matter: Litter Size Strongly Determines Adult Metabolism in Rodents*. Cell Metab, 2020. **32**(3): p. 334-340.
276. Hayward, C.S., R.P. Kelly, and P. Collins, *The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(1): p. 28-49.
277. Parker, W.H., et al., *Effect of bilateral oophorectomy on women's long-term health*. Womens Health (Lond), 2009. **5**(5): p. 565-76.
278. Iorga, A., et al., *The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy*. Biol Sex Differ, 2017. **8**(1): p. 33.
279. Zhai, P., et al., *Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(5): p. H1640-7.
280. Zhai, P., et al., *Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(6): p. H2766-75.

281. Organization, W.H., *WHO European Regional Obesity Report*. WHO Regional Office for Europe: Copenhagen, Denmark, 2022.
282. Bounhoure, J.P., D. Carrie, and J. Puel, [*Coronary syndromes in the elderly*]. *Bull Acad Natl Med*, 2006. **190**(4-5): p. 807-16; discussion 816, 873-6.
283. Kannel, W.B., *Cardiovascular risk factors in the elderly*. *Coron Artery Dis*, 1997. **8**(8-9): p. 565-75.
284. Aubert, R., J.P. Suquet, and D. Lemonnier, *Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice*. *J Nutr*, 1980. **110**(4): p. 649-61.
285. Plagemann, A., et al., *Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding*. *J Perinat Med*, 2010. **38**(4): p. 393-400.
286. Davidowa, H. and A. Plagemann, *Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats*. *Neuroreport*, 2007. **18**(5): p. 521-4.
287. Gali Ramamoorthy, T., et al., *Maternal overnutrition programs epigenetic changes in the regulatory regions of hypothalamic Pomc in the offspring of rats*. *Int J Obes (Lond)*, 2018. **42**(8): p. 1431-1444.
288. Chen, H., et al., *Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism*. *Endocrinology*, 2008. **149**(11): p. 5348-56.
289. Clavere, N.G., et al., *Correction: Inhibition of activin A receptor signalling attenuates age-related pathological cardiac remodelling*. *Dis Model Mech*, 2022. **15**(8).
290. Wattanapitayakul, S.K. and J.A. Bauer, *Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications*. *Pharmacol Ther*, 2001. **89**(2): p. 187-206.
291. Qin, F., M. Simeone, and R. Patel, *Inhibition of NADPH oxidase reduces myocardial oxidative stress and apoptosis and improves cardiac function in heart failure after myocardial infarction*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(2): p. 271-81.
292. Zweier, J.L. and M.A. Talukder, *The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2006. **70**(2): p. 181-90.
293. Levrard, S., et al., *Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(6): p. 886-95.
294. Tanenbaum, D.M., et al., *Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 5998-6003.
295. Feng, J.R., et al., [*Intervention effects of estradiol on myocardial ischemia- reperfusion injury of rat and its mechanisms*]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2022. **38**(6): p. 638-643.
296. Zhu, X., et al., *Estrogens increase cystathionine-gamma-lyase expression and decrease inflammation and oxidative stress in the myocardium of ovariectomized rats*. *Menopause*, 2013. **20**(10): p. 1084-91.
297. Wang, F., et al., *Female adult mouse cardiomyocytes are protected against oxidative stress*. *Hypertension*, 2010. **55**(5): p. 1172-8.
298. Martins, M.R., et al., *Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice*. *J Endocrinol*, 2008. **198**(3): p. 591-8.
299. Balonan, L.C. and H.P. Sheng, *Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats*. *Pediatr Res*, 2000. **48**(5): p. 668-73.
300. Hou, M., et al., *Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats*. *PLoS One*, 2011. **6**(11): p. e25726.
301. Battault, S., et al., *Myocardial glucotoxicity: Mechanisms and potential therapeutic targets*. *Arch Cardiovasc Dis*, 2020. **113**(11): p. 736-748.
302. Jia, G., M.A. Hill, and J.R. Sowers, *Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity*. *Circ Res*, 2018. **122**(4): p. 624-638.
303. Clark, R.J., et al., *Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(45): p. 44230-7.
304. Davidoff, A.J., et al., *Diabetic cardiomyocyte dysfunction and myocyte insulin resistance: role of glucose-induced PKC activity*. *Mol Cell Biochem*, 2004. **262**(1-2): p. 155-63.

305. Aguilar, H., et al., *Role for high-glucose-induced protein O-GlcNAcylation in stimulating cardiac fibroblast collagen synthesis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. **306**(9): p. C794-804.
306. Joseph, D., et al., *The detrimental effects of acute hyperglycemia on myocardial glucose uptake*. *Life Sci*, 2014. **105**(1-2): p. 31-42.
307. Boudina, S. and E.D. Abel, *Diabetic cardiomyopathy revisited*. *Circulation*, 2007. **115**(25): p. 3213-23.



Titre : Impact à long terme de la programmation nutritionnelle postnatale sur le risque cardio-métabolique et sur la sensibilité aux lésions d'ischémie-reperfusion *in vivo* chez la souris

Mots clés : Suralimentation postnatale, risque cardio-métabolique, ischémie-reperfusion.

Résumé : Les troubles nutritionnels survenant pendant les périodes fœtales et postnatales peuvent être responsables d'une prédisposition aux maladies cardio-métaboliques à l'âge adulte. Le modèle de Suralimentation PostNatale (SAPN), induit par la réduction de la taille des portées, récapitule de façon pertinente les mécanismes physiopathologiques d'une programmation d'un risque cardio-métabolique accru chez l'individu, qu'il soit de sexe masculin ou féminin. Cependant, dans le domaine préclinique, la majorité des travaux a été conduit chez des rongeurs mâles de 2 à 4 mois d'âge.

Chez les souris mâles, la SAPN a induit un surpoids associé à des désordres du métabolisme glucidique de façon précoce et permanente (4 à 18 mois). La fonction contractile cardiaque était diminuée par la SAPN et la sensibilité des coeurs aux lésions d'ischémie-reperfusion (I/R) induites *in vivo*

était accrue et associée à une augmentation de la masse du tissu adipeux péricardique ainsi que de son statut inflammatoire. Chez les femelles, la SAPN a induit des altérations cardio-métaboliques similaires, cependant, la sensibilité des coeurs aux lésions d'I/R induites *in vivo* n'a pas été impactée.

Ces résultats montrent qu'une SAPN prédispose l'organisme des souris mâles et femelles aux maladies cardio-métaboliques précocément (dès 4 mois) et durablement (jusqu'à 18 mois de vie), mais qu'elle n'affecte que les mâles pour la susceptibilité aux lésions ischémiques cardiaques.

Ce modèle original de SAPN constitue un modèle préclinique pertinent de syndrome métabolique tel qu'il est généralement constaté chez l'humain, et sur lequel des études physiopathologiques et thérapeutiques plus représentatives de la pathologie clinique pourraient être menées.

Title: Long-term impact of postnatal nutritional programming on cardio-metabolism risk and on sensitivity to ischemia-reperfusion injury *in vivo* in mice

Keywords: Postnatal overfeeding, cardio-metabolism risk, ischemia reperfusion

Abstract: Nutritional disorders occurring during the foetal and postnatal periods may be responsible for a predisposition to cardio-metabolic diseases in adulthood. The PostNatal OverFeeding (PNOF) model, induced by litter size reduction, pertinently recapitulates the pathophysiological mechanisms of a programmed increase of cardiometabolic risk. However, most of preclinical data has been obtained in young male animals.

In male mice, PNOF induced an increase in body weight associated with glucose metabolism impairment at young and older ages (4 to 18 months). Cardiac contractile function was reduced by PNOF and the sensitivity of hearts to *in vivo* ischemia-reperfusion (I/R) injury was increased and associated with an

augmentation in pericardial adipose tissue mass and inflammatory status. In females, PNOF induced similar cardio-metabolic alterations; however, the sensitivity of hearts to I/R lesions induced *in vivo* was not impacted. These results show that PNOF predisposes the organism of male and female mice to cardio-metabolic diseases from the young (4 months) to the older ages (up to 18 months); however, PNOF only affects males for an increased sensitivity to ischemic cardiac lesions.

This original model of PNOF could constitute a model of "natural" metabolic syndrome on which physiopathological and therapeutic studies could be carried out.