



HAL
open science

Etude des conséquences métaboliques, oxydatives et cardiovasculaires de la suralimentation postnatale chez le rat et la souris

Ahmed Habbout

► **To cite this version:**

Ahmed Habbout. Etude des conséquences métaboliques, oxydatives et cardiovasculaires de la suralimentation postnatale chez le rat et la souris. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS023 . tel-00818897

HAL Id: tel-00818897

<https://theses.hal.science/tel-00818897>

Submitted on 29 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Année 2012

Thèse n°.....

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Option : Physiopathologie et Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement
Le 23 Mai 2012

par **Ahmed HABBOUT**

ÉTUDE DES CONSÉQUENCES MÉTABOLIQUES, OXYDATIVES ET CARDIOVASCULAIRES DE LA SURALIMENTATION POSTNATALE CHEZ LE RAT ET LA SOURIS

*Travail réalisé au sein de l'unité INSERM U866
Equipe 5 : Stress oxydant et risque cardio-métabolique : interactions fondamentales et
cliniques.*

Membres du Jury :

Dr Laurent LAGROST	Université de Bourgogne	Examineur
Dr Luc DEMAISON	Université de Grenoble-I	Rapporteur
Dr Céline FASSOT-LUCHT	Université d'Angers	Rapporteur
Dr Charles-Henry COTTART	Université Paris Descartes	Examineur
Pr Luc ROCHETTE	Université de Bourgogne	Examineur
Pr Catherine VERGELY	Université de Bourgogne	Directeur

"Dans le processus de la découverte scientifique, le degré de créativité du chercheur reflète un peu sa part de génie. Loin de la simple maîtrise savante des acquis dans un domaine scientifique, c'est au contraire la capacité à s'extraire des corpus théoriques antérieurs qui permet d'apporter un regard novateur sur une situation, un problème ou une apparente banalité."

ESTINGOY Pierrette, 2003, « **De la créativité chez le chercheur** ». In *Histoires de Sciences Médicales*, t.37, n°4, 2003, p. 489-499.

Remerciements

J'exprime tout d'abord mes remerciements à ma directrice de Thèse, le Professeur Catherine Vergely. Merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce travail tout en mettant à ma disposition les moyens d'y parvenir. Un grand merci également pour ta rigueur scientifique et surtout pour ton encadrement et aussi pour m'avoir laissé une certaine autonomie. Je dois dire que m'encadrer n'était pas une mince affaire mais tu as su relever brillamment le « défi ». Continue à encadrer des étudiants et de les amener loin et haut comme tu l'as fait pour moi.

Mes remerciements s'adressent aussi au Professeur Luc Rochette, pour m'avoir accepté au sein de son Laboratoire. Votre passion pour la Recherche a fait de vous une personne riche en connaissances. Vous êtes une « grande » personne, mêlant qualités humaines et professionnelles qui forcent mon admiration.

J'exprime ensuite mes remerciements aux membres du jury :

Au Docteur Laurent Lagrost, directeur du Centre de Recherches Inserm Lipides Nutrition Cancer (UMR 866) qui m'a fait l'honneur d'assister à mon jury de Thèse et de m'avoir accepté dans son Laboratoire pour effectuer mon stage de Master 2 Recherche qui m'a permis de poursuivre en Doctorat.

Au Docteur Luc Demaison, chargé de recherche à l'INRA de Grenoble pour avoir accepté de bien vouloir faire partie de mon jury de Thèse en tant que rapporteur, d'avoir consacré du temps à examiner et juger ce travail, malgré l'envoi tardif du manuscrit. Ses compétences en physiologie cardiaque en font un conseiller de choix.

Au Docteur Céline Fassot-Lucht, chargée de recherche à l'Inserm UMR1083 pour avoir accepté également de faire partie de mon jury de Thèse en tant que rapporteur malgré un court délai pour l'examen approfondi de ce manuscrit. Ses connaissances, son expérience et son aide précieuse dans l'étude du transcriptome en font une conseillère avertie.

Au Docteur Charles-Henry Cottart, Maître de Conférences à l'U.F.R de Pharmacie à l'Université Paris Descartes, en tant qu'examineur, tout en y apportant ses compétences et son expertise dans la biologie du vieillissement.

Je suis très honoré de votre investissement dans la lecture et l'examen de cette Thèse. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Merci au Docteur Stéphanie Delemasure-Chalumeau pour m'avoir formé à la technique du cœur isolé perfusé chez le rat et la souris et pour ses précieux conseils indispensables à l'acquisition de la technique et à l'obtention de résultats reproductifs.

Mes remerciements vont aussi au Docteur Jean-Claude Guillard pour les différents dosages de vitamines, au Docteur Daniel Moreau pour ses remarques et conseils avisés lors des réunions de Laboratoire.

Je remercie également le centre de zootechnie dirigé par Valérie Saint-Gorgio pour avoir pris soin de mes rongeurs qui m'ont donné des résultats encourageants.

A Julie, pour ses compétences informatiques et pour la mise en page (Word, Excel...), sa bonne humeur et surtout pour avoir fermé les portes du Laboratoire quand j'étais le dernier à partir ce qui me faisait gagner 20 secondes !!!

A Arthur, pour toutes les discussions enrichissantes le midi au RU, pour tes conseils sur les manips de Q-PCR et de Western et surtout pour les cafés post déjeuner.

Aux internes ; Kader pour la Pharmacie, Karim et Aziz (Charles) pour la Cardio, mes deux « avocats ». Vous êtes OP pour se « casser le ventre » ? Vous êtes arrivés au cours de ma dernière année de Thèse mais j'ai eu le temps de bien rire avec vous, à m'en « casser les abdos ».

A Françoise Arnos, pour toutes les commandes tardives que je lui demandais d'effectuer, pour son sourire et pour les discussions diverses et variées.

Merci à tous les autres membres du Laboratoire : Eve Rigal, l'équipe COHIRO et aux stagiaires pour les petits cafés matinaux souvent accompagnés de petits gâteaux.

A Laure-Audrey, un grand merci pour sa patience, son soutien, sa présence et bien plus encore...

Un merci également à mes amis du quartier neuf de Langres, avec qui les barres de rire étaient assurées lors de mes weekends. Votre « scientifique du quartier » ne vous a pas oublié et vous a représenté même au sein du labo notamment avec vos expressions qui ont trouvé preneurs chez certains collègues comme celle-ci : « elle est belle » (la situation).

Bien évidemment je remercie mes sœurs pour leur soutien et ma mère Zahra qui a toujours cru en moi et m'a toujours soutenu. Je me souviens encore quand tu me demandais si j'avais fait mes devoirs, que je te répondais « oui » alors que je ne les avais pas fait ... Cette Thèse est pour toi ainsi qu'à toute la famille.

Résumé

L'excès de masse grasse, notamment infantile est en perpétuelle augmentation à l'échelle mondiale. Plusieurs études ont montré une association entre cette prise de poids et la survenue de pathologies cardiovasculaires. Cependant, il semble nécessaire de renforcer notre compréhension des liens existant entre la survenue de maladies cardiovasculaires à l'âge adulte et l'existence d'un surpoids durant l'enfance et/ou l'adolescence. Afin de répondre à cette problématique, nous avons utilisé un modèle de suralimentation postnatale chez le rongeur, basé sur la réduction des portées à la naissance. Ainsi, les travaux réalisés au cours de ce Doctorat ont permis de mettre en évidence l'impact d'une surnutrition postnatale précoce sur le développement ultérieur d'altérations cardio-métaboliques.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'une prise de poids précoce, chez le rat et la souris, induisait une augmentation pérenne de la masse corporelle adipeuse, associée à des perturbations des paramètres biochimiques, représentées par une augmentation de la glycémie, de l'insuline, du cholestérol et de la leptine plasmatique.

Dans un deuxième temps, le volet oxydant a été exploré. Ainsi, les animaux ayant subi une suralimentation postnatale, une fois adultes, voient leur niveau de stress nitro-oxydant augmenter au niveau circulant et sur le plan tissulaire cardiaque, alors que des enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutases et les catalases y présentent une activité augmentée.

Dans un troisième temps, l'exploration de la fonction cardiovasculaire a montré, *in vivo*, que la suralimentation postnatale réduisait de manière significative la contractilité myocardique et induisait une augmentation des niveaux de pression artérielle systolique et diastolique chez la souris. *Ex vivo*, les cœurs de souris adultes ayant subi une suralimentation postnatale présentaient une plus grande sensibilité aux lésions induites par l'ischémie reperfusion, libérant plus d'enzyme lactate deshydrogénase (LDH) et montrant une taille de nécrose ventriculaire très significativement accrue. De plus, l'étude du remodelage cardiaque a montré chez ces animaux une augmentation de la fibrose associée à une augmentation à la fois de l'expression et de l'activité des métallo-protéinases de type 2 (MMP-2).

Enfin, d'un point de vue de l'expression génique cardiaque, notre étude montre que la suralimentation postnatale induit très précocement, dès le sevrage, des différences d'expression portant sur plus de 822 gènes cardiaques, et notamment des gènes de structure comme ceux d'isoformes du collagène ou de protéines de la matrice extracellulaire, ce qui pourrait expliquer la présence d'un remodelage d'origine précoce.

Il est évident que des travaux supplémentaires s'imposent afin d'expliquer les mécanismes mis en jeu au cours de ces différentes altérations. Cependant, il apparaît clairement que des modifications nutritionnelles lors d'une période du développement suivant immédiatement la naissance peuvent induire à long terme des altérations d'ordre biochimique, oxydative et cardiovasculaires.

Mots clés : Suralimentation postnatale, stress oxydant, cœur, ischémie, fibrose.

Liste des abréviations	VI
Liste des figures	IX
PARTIE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. Physiopathologie du surpoids	2
1. Définition et prévalence du surpoids	2
2. Prévalence du surpoids en France	3
3. Le tissu adipeux	4
3.1. L'adipocyte	4
3.2. Le tissu adipeux brun	5
3.3. Le tissu adipeux blanc	5
3.4. Le tissu adipeux : une glande endocrine	6
3.4.1. La leptine	6
3.4.2. L'adiponectine	9
3.4.3. L'apeline	10
3.4.4. La visfatine	11
3.4.5. La résistine	12
4. Causes du surpoids	12
4.1. Facteurs génétiques	12
4.2. Facteurs endocriniens	13
4.3. Facteurs environnementaux précoces	13
5. La suralimentation postnatale	14
6. Le syndrome métabolique	16
7. Surpoids et anomalies métaboliques	17
7.1. Dyslipidémie	17
7.2. Insulinorésistance	18
7.2.1. Au niveau musculaire squelettique	19
7.2.2. Au niveau hépatique	19
7.2.3. Au niveau du tissu adipeux	19
8. Le surpoids et les maladies cardiovasculaires	20
9. Le surpoids et le stress oxydant	21
II. Stress oxydant	23
1. Définition	23
2. Les mécanismes pro-oxydants	23

2.1. Les radicaux libres de l'oxygène et de l'azote _____	23
2.1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) _____	23
2.1.2. Le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) _____	25
2.1.3. Le monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$) _____	25
2.2. Les dérivés non radicalaires _____	26
2.2.1. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) _____	26
2.2.2. Peroxynitrite ($ONOO^-$) _____	26
2.2.3. L'acide hypochloreux HOCl _____	26
2.2.4. L'oxygène singulet 1O_2 _____	27
2.3. Sources génératrices d'espèces réactives _____	27
2.3.1. La chaîne respiratoire mitochondriale _____	27
2.3.2. Les NADPH oxydases _____	27
2.3.3. Les NOS _____	28
2.3.4. Les xanthines oxydoréductases _____	29
2.3.5. Les myéloperoxydases _____	29
2.3.6. Les lipoxygénases _____	30
2.3.7. L'auto-oxydation des molécules _____	30
2.3.8. Le réticulum endoplasmique _____	30
3. Les mécanismes antioxydants _____	31
3.1. Les enzymes _____	31
3.1.1. Les SOD (superoxydes dismutases) _____	31
3.1.2. Les catalases _____	31
3.1.3. Les glutathion peroxydases (GPx) _____	32
3.1.4. La thiorédoxine _____	33
3.2. Les molécules antioxydantes _____	33
3.2.1. La vitamine E _____	33
3.2.2. La vitamine C _____	34
3.2.3. Sélénium _____	35
3.2.4. Le zinc _____	35
3.3. Le stress oxydant et les dégâts cellulaires _____	35
3.3.1. Oxydation des lipides (peroxydation lipidique) _____	36
3.3.2. Oxydation des protéines _____	36
3.3.3. Oxydation de l'ADN _____	36
4. Le stress oxydant dans la physiopathologie cardiovasculaire _____	37

III. Physiopathologie cardiovasculaire	39
1. La croissance cardiaque : du fœtus à l'adulte	39
1.1. Le cœur fœtal	39
1.2. Le cœur en période postnatale	39
1.3. Le cœur adulte	39
2. Le métabolisme cardiaque	40
2.1. Catabolisme des acides gras	40
2.2. La glycolyse	42
2.3. Utilisation du lactate	42
3. Ischémie-reperfusion myocardique	43
3.1. L'ischémie myocardique	43
3.2. L'ischémie régionale	44
3.3. L'ischémie globale	44
3.4. La sidération myocardique	45
3.5. La reperfusion myocardique	46
3.6. Les lésions de reperfusion	46
4. La cicatrisation et le remodelage post-infarctus	47
4.1. La cicatrisation	47
4.2. Le remodelage cardiaque	49
4.3. Expansion de la zone nécrosée	49
4.4. Dilatation et hypertrophie de la zone non nécrosée	49
4.5. La fibrose cardiaque	50
5. Structure et fonction cardiaque au cours du surpoids	51
IV. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE LA THESE	53
PARTIE II. ETUDES EXPERIMENTALES	55
Introduction	56
ARTICLE I	60
ARTICLE II	69
PARTIE III. DISCUSSION GENERALE	111
DISCUSSION GENERALE	112
PARTIE IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	121
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
PARTIE V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	124

Liste des communications	_____	144
Liste des publications	_____	147

Liste des abréviations

AAA : Anévrisme de l'Aorte Abdominale

Acrp30 : Adipocyte complement-related protein of 30 kDa

AdipoR1, 2 : Adiponectin Receptor 1, 2

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ag II : Angiotensine II

AGRT : Agouti Related Transcript

AMP : Adénosine Monophosphate

AMPC : Adénosine Monophosphate cyclique

APM1 : Adipose most abundant gene transcript 1

ATP : Adénosine Triphosphate

BH₄ : Tetrahydrobiopterin

CART : Cocaïne and Amphetamine-Regulated Transcript

CM : Chylomicron

Cu,Zn-SOD : Cuivre, Zinc-Superoxyde dismutase

CPT-1, 2 : Carnitine Palmitoyltransférase-1, 2

DHA : Dehydroascorbate

EC : Ester de Cholesterol

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

FATP : Fatty Acid Transporters Protein

FGF : Fibroblast Growth Factor

GBP28 : Gelatin-Binding Protein 28

GH : Growth Hormone

GLUT : Glucose Transporter

Gpx : Gluthation peroxydase

HDL : High Density Lipoprotein

H-FABP : Heart-Fatty Acid Binding Protein
HIF1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1 α
HVG : Hypertrophie Ventriculaire Gauche
4-HNE : 4-hydroxynonanal
HSP : Heat Shock Protein
HTA : Hypertension Artérielle
HWM : High Weight Mass
IDF : International Diabetes Federation
IDL: Intermediate Density Lipoprotein
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL-1 β , 6, 8, 10 : Interleukine-1 β , 6, 8, 10
IMC : Indice de Masse Corporelle
IRS-1 : Insulin Receptor Substrate 1
JAK : Janus Kinase
LDH : Lactate Déshydrogénase
LDL : Low Density Lipoprotein
LEP : Leptin
LEPR : Leptin Receptor
LHS : Lipase Hormonosensible
LO : Lipoxygénase
LPL : Lipoprotéine Lipase
LPS : Lipopolysaccharide
LWM : Low Weight Mass
MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase
MC4R : Melanocortin 4 Receptor
MDA : Malondialdehyde
MDHA : Monodehydroascorbic Acide
MEC : Matrice extracellulaire
MMPs : Matrix Metalloproteinases

MPO : Myeloperoxydase
mPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore
NGF : Nerve Growth Factor
NPY : Neuropeptide Y
ObR : Obese receptor
PAF-AH : Platelet Activating Factor-acetylhydrolase
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1
PCSK1 : Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 1
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PL : Phospholipide
PMN : Polymorphonucleocytes
POMC : Pro-opio-mélanocortine
PON1 : Paraxonase-1
Prx3 : Peroxyredoxine 3
RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin
SIM1 : Single-minded homolog 1
SRA : Système Rénine Angiotensine
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TG : Triglycerides
TGF- β : Transforming growth factor- β
TLR 2, 4 : Toll-like Receptor 2, 4
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
Trx : Thiorédoxine
UCP-1 : Uncoupling Protein 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Liste des figures

Figure 1 : Proportion d'enfants en surpoids âgés de 5 à 6 ans dans les différentes régions françaises. _____	4
Figure 2 : Représentation schématique d'un adipocyte blanc. _____	5
Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la leptine. _____	7
Figure 4 : Voie de signalisation du récepteur de la leptine. _____	9
Figure 5 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale. _____	24
Figure 6 : Représentation schématique des différents co-facteurs et réactions catalysées par les NOS. _____	29
Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la Mn-SOD humaine. _____	31
Figure 8 : Schéma représentant les interrelations entre les différentes enzymes antioxydantes. _____	32
Figure 9 : Régénération de la vitamine E par l'acide ascorbique. _____	34
Figure 10 : Régénération de la vitamine E à partir de sa forme radicalaire et synergies probables entre différents couples oxydoréducteurs. _____	34
Figure 11 : Représentation schématique de la voie utilisant des acides gras libres comme substrat énergétique dans le myocarde. _____	41
Figure 12 : Schématisation du métabolisme énergétique dans le muscle cardiaque. _____	42
Figure 13 : Schéma représentant l'expansion de la nécrose en fonction du temps depuis l'occlusion de l'artère coupable. _____	45
Figure 14 : Schéma des régulations autocrines et paracrines induisant la synthèse de collagène et de la matrice extracellulaire (MEC) responsable de la fibrose. _____	48
Figure 15 : Schéma représentant les effets de la suralimentation postnatale. _____	120

PARTIE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Physiopathologie du surpoids

1. Définition et prévalence du surpoids

Selon l'OMS, le surpoids se définit par une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle pouvant avoir une influence sur l'état de santé de l'individu. Bien qu'il existe plusieurs méthodes d'évaluation de la masse grasse, l'indice le plus couramment utilisé actuellement chez l'homme est basé sur le rapport poids/taille² (kg/m²). Cet indice, appelé Indice de Masse Corporelle (IMC) ou BMI (Body Mass Index), a la particularité d'être constant entre les individus de même sexe, de même corpulence et de même âge. L'interprétation de l'IMC se fait de la manière suivante :

- IMC < 16,5 : dénutrition ou famine
- 16,5 < IMC < 18,5 : maigreur
- 18,5 < IMC < 25 : corpulence normale
- 25 < IMC < 30 : surpoids
- 30 < IMC < 35 : obésité modérée
- 35 < IMC < 40 : obésité sévère
- IMC > 40 : obésité morbide

Chez l'enfant, l'utilisation de cet indice requiert la connaissance de l'évolution de l'IMC, car il se modifie de manière parallèle au taux de masse grasse. La première phase correspond à une augmentation de cet indice pendant la première année de vie, puis d'une phase de diminution jusqu'à l'âge d'environ 6 ans, suivi d'un rebond d'adiposité correspondant à nouveau à une augmentation de l'IMC. Il est recommandé d'utiliser cet indice avec les courbes présentes dans le carnet de santé de l'enfant afin d'évaluer de manière la plus juste possible une éventuelle augmentation importante de la masse grasse.

Il existe également d'autres méthodes classiquement utilisées en clinique, la mesure du pli cutané et celle des rapports entre les circonférences *taille/hanche* et *taille/cuisse*. Cependant, contrairement à l'adulte, ces rapports ne s'appliquent pas de manière systématique à l'enfant. En effet, chez celui-ci, la répartition de la masse grasse se fait de manière dite androïde (au niveau du tronc et de l'abdomen), et par conséquent seule la mesure de la circonférence de la taille est utilisée chez l'enfant afin d'évaluer le surpoids éventuel. Enfin, les courbes *taille/âge* et *poids/âge*, disponibles dans les carnets de santé, permettent un suivi dès l'enfance de la prise de masse grasse. Ces courbes sont basées sur

une étude internationale sur la croissance, coordonnée par le Centre International de l'Enfance.

Aujourd'hui, le surpoids est considéré, au même titre que l'obésité, comme étant une « épidémie mondiale ». Longtemps restreint aux seuls pays industrialisés, le surpoids touche aujourd'hui également les pays en voie de développement. En 2005, les chiffres avancés par l'OMS montraient qu'il y avait environ 1,6 milliard d'adultes (âgés de plus de 15 ans) et 20 millions d'enfants en surpoids (IMC > 25). Les diverses études épidémiologiques montrent que la prévalence est à la fois forte et progressive. L'OMS estime que d'ici 2015, le nombre d'adultes en surpoids sera de 2,3 milliards (obésité et surpoids, archive OMS), alors que le surpoids des enfants de moins de 5 ans est estimé à 43 millions.

2. Prévalence du surpoids en France

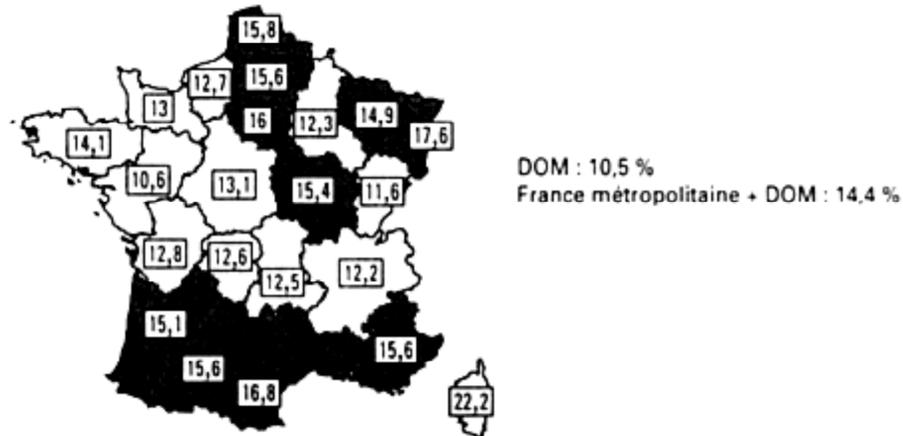
Selon le rapport publié le 10 novembre 2009 suite à l'enquête Obepi-Roche (ObEpi-Roche, 2009), la prévalence déclarée du surpoids adulte en France atteignait 31,9 %. L'augmentation de la prévalence du surpoids se fait parallèlement à celle de l'obésité, qui en 1997 était de 8,5 % contre 14,5 % en 2009.

Il existe une disparité régionale sur le territoire français. En effet, les zones de l'Est et du Nord de la France restent les zones géographiques où la prévalence du surpoids de l'adulte est la plus élevée.

Chez les enfants, des enquêtes ont montré que la prévalence du surpoids, obésité incluse, était de 16,3 % chez ceux âgés de 7 à 9 ans selon les normes françaises (De Peretti and Castetbon 2004).

D'un point de vue régional, la répartition du surpoids de l'enfant est là-aussi inégale (figure 1), en effet, l'Alsace, le Languedoc-Roussillon, l'Ile-de-France, les régions Nord- Pas-de-Calais et Picardie ainsi que toutes les régions du Sud ont des prévalences élevées.

Proportion d'enfants de 5 à 6 ans en surpoids



Source : Drees-Desco-InVS – enquête auprès des enfants scolarisés en grande section de maternelle 1999-2000

Figure 1 : Proportion d'enfants en surpoids âgés de 5 à 6 ans dans les différentes régions françaises.

Les différentes études montrent des chiffres à la hausse, laissant prévoir une aggravation de cette « épidémie », à la fois chez l'adulte mais également chez l'enfant.

3. Le tissu adipeux

3.1. L'adipocyte

L'adipocyte est une cellule de 30 à 100 µm de diamètre, composée pour l'essentiel d'une vacuole lipidique plus ou moins importante repoussant le noyau en périphérie. La vacuole lipidique contient 99% de triglycérides formés par l'estérification d'une molécule de glycérol avec trois molécules d'acides gras, 0,6% de composés insaponifiables, 0,4% de cholestérol et 0,2% de phospholipides.

Parmi les nombreux rôles de l'adipocyte, sa fonction majeure consiste en la mise en réserve des acides gras libres sous forme de triglycérides de valeur énergétique élevée, stockés dans la vacuole lipidique. La stimulation α 2-adrénergique stimule la lipogenèse alors que celle des récepteurs β -adrénergiques déclenche la libération d'acides gras (lipolyse).

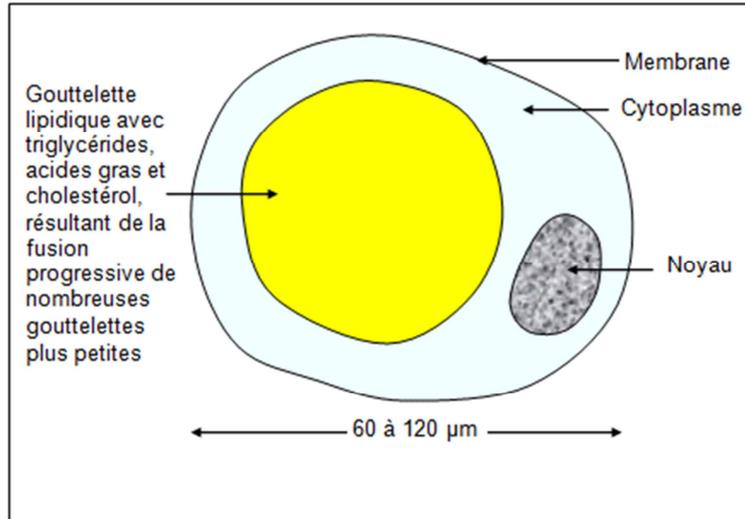


Figure 2 : Représentation schématique d'un adipocyte blanc.

Dans l'organisme, les adipocytes sont la plupart du temps regroupés sous forme de tissu adipeux, dont on distingue deux catégories différentes : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc.

3.2. Le tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est présent chez tous les mammifères, mais il est peu présent dans l'espèce humaine, sauf chez le nouveau-né où il assure un rôle essentiel dans la thermogénèse. Les adipocytes bruns ont une forte capacité d'oxydation des substrats grâce à un très grand nombre de mitochondries présentes dans leur cytoplasme, leur permettant ainsi d'assurer la production de chaleur par l'intermédiaire de la protéine découplante UCP-1 (uncoupling protein-1). Cette protéine permet de dissiper le gradient électrochimique indépendamment de l'ATP synthase, ce qui a pour conséquence de dissocier le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP, l'énergie étant alors libérée sous forme de chaleur.

3.3. Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est constitué de plusieurs types cellulaires dont les adipocytes représentent la plus grande part, les autres cellules correspondant à des macrophages, des cellules vasculaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) et des fibroblastes. Le rôle principal du tissu adipeux blanc est d'assurer le stockage et la mobilisation de l'énergie.

La lipogenèse, ou synthèse des triglycérides (à haute valeur énergétique) à partir d'acides gras et de glucides est essentiellement sous le contrôle de l'insuline.

Les acides gras libres issus de l'alimentation pénètrent dans les adipocytes pour y être associés au glycérol et former des triglycérides sous l'action de la triglycéride synthétase.

En ce qui concerne les glucides, le glucose pénètre dans les adipocytes à l'aide de transporteurs tels que les transporteurs GLUT, puis il est hydrolysé dans le cytoplasme en pyruvate. Lorsque la charge énergétique en ATP est forte, le citrate issu du pyruvate sort de la mitochondrie et initie la synthèse d'acides gras puis de triglycérides.

Quand les besoins énergétiques ne sont pas suffisamment assurés par l'alimentation, la lipolyse intervient pour compenser ce déficit. Elle correspond à l'hydrolyse des triglycérides en glycérol et acides gras libres par la lipase hormonosensible (LHS) dont l'activité est inhibée par l'insuline. Les catécholamines comme l'adrénaline augmentent les taux d'AMPc, activant les protéines kinase A qui vont stimuler par phosphorylation la LHS.

3.4. Le tissu adipeux : une glande endocrine

Pendant longtemps, le tissu adipeux a été considéré comme étant uniquement un tissu de réserve énergétique. Depuis une vingtaine d'années, un très grand nombre d'études a clairement montré que ce dernier constitue une véritable glande endocrine à l'origine de la sécrétion de très nombreuses molécules bioactives (Ahima and Flier 2000), lui permettant d'interagir, de manière endocrine ou paracrine, avec d'autres organes. Ces molécules sont désignées sous le nom d'adipokines (ou adipocytokines). Elles interviennent dans de nombreux processus physiologiques tels que le contrôle de l'homéostasie énergétique, l'immunité, la sensibilité à l'insuline, l'angiogenèse, l'inflammation ou encore le métabolisme lipidique. Parmi ces adipokines, les plus connues sont : la leptine, l'adiponectine, l'apeline, la résistine, la visfatine, le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1), mais également certaines cytokines : le TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-10 (Otero et al. 2005). La capacité du tissu adipeux à produire des cytokines fait de l'adipocyte un candidat de choix dans l'instauration d'un état inflammatoire chronique de bas niveau, observé chez les sujets en surcharge pondérale. Deux de ces adipokines, la leptine et l'adiponectine seraient particulièrement impliquées dans les complications cardiovasculaires du surpoids et de l'obésité.

3.4.1. La leptine

La leptine (« leptos » qui signifie maigre) est une hormone de 16 kDa encodée par le gène *ob* (obese) et sécrétée quasi exclusivement par l'adipocyte. La déficience en leptine a été

identifiée comme étant responsable de l'obésité chez la souris invalidée pour le gène *ob* (Zhang et al. 1994). Sa forme mature de 146 acides aminés résulte du clivage d'un propeptide de 167 acides aminés. Elle possède une structure de 4 hélices α et de 2 feuillets β . La leptine est sécrétée de façon pulsatile, suivant un rythme circadien, la concentration maximale étant enregistrée durant la phase nocturne. Majoritairement produite par le tissu adipeux blanc sous-cutané, ses taux plasmatiques sont directement reliés à l'indice de masse corporelle (IMC), variant de 10 à 20 ng/ml chez les individus de poids normal (Maffei et al. 1995). Toutefois, il existe des différences de concentration en fonction du sexe ; en effet, pour un même IMC, la production de leptine est de 75% plus élevée chez les femmes que chez les hommes, probablement en raison d'une présence plus abondante de graisse sous-cutanée (Maffei et al. 1995).

La leptine est aussi produite par l'estomac (Bado et al. 1998), le placenta (Hoggard et al. 1997), les glandes mammaires (Smith-Kirwin et al. 1998), les glandes surrénales (Glasow and Bornstein 2000), les muscles squelettiques (J. Wang et al. 1998) et enfin au niveau central par l'hypothalamus, le cervelet, le cortex et l'hypophyse (Jimerson et al. 2000; Morash et al. 1999).

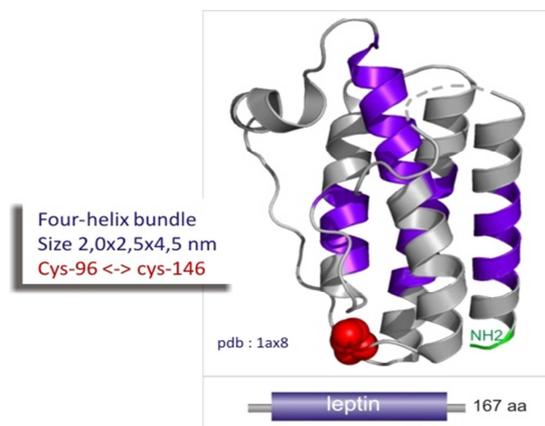


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la leptine.

La leptine agit sur son principal tissu-cible, l'hypothalamus après s'être liée à un récepteur de type « cytokine » qui lui est propre (ob-Rb).

Le rôle physiologique principal de la leptine est de réguler les centres de la satiété et de la faim, ceci par un mécanisme de rétrocontrôle, en inhibant l'expression du NPY (Neuropeptide Y) et de l'AGRT (agouti related transcript), peptides anaboliques et orexigènes. A l'inverse, elle augmente la production de peptides cataboliques (POMC, pro-

opio-mélanocortine ; CART, cocaïne and amphetamine-regulated transcript). Par ce biais, elle exerce ses principaux effets centraux : induction de satiété et adaptation neuroendocrinienne au jeûne.

En plus de ses effets au niveau central, la leptine agit également au niveau périphérique, notamment en diminuant la sécrétion de l'insuline et en stimulant la gluconéogenèse hépatique (Pellemounter et al. 1995). Il a également été démontré que la leptine agissait sur la régulation de l'angiogenèse via l'augmentation de l'expression du VEGF (Sierra-Honigmann et al. 1998) et sur l'accélération de la maturation des organes reproducteurs chez la souris (Chehab et al. 1997).

Il existe trois catégories distinctes de récepteurs de la leptine (appelé ObR ou LEPR) : l'isoforme dite longue ou ObRb, l'isoforme courte ou ObRs (a, c, d, f) possédant un domaine intracellulaire réduit et l'isoforme circulante ou ObRe ne possédant pas de domaine intracellulaire et membranaire. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs de cytokines ne possédant pas d'activité enzymatique intrinsèque (kinase). L'activation de ces récepteurs passe donc par l'intermédiaire de protéines à activité tyrosine kinase telles que les JAK (Janus Kinase), qui vont activer ces récepteurs après leur changement conformationnel induit par la fixation de la leptine.

Le récepteur ObRb peut être considéré comme l'isoforme la plus importante. En effet, la mutation de ObRb (conduisant à un allèle non fonctionnel) retrouvée chez les souris *db/db* (correspondant au gène *diabetes*) (Chen H et al., 1996) induit une obésité accompagnée d'une déficience des voies de signalisation notamment la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) (Figure 4). Bien que l'isoforme ObRa possède un domaine intracellulaire plus court, il a été démontré qu'elle est capable d'induire l'activation de certaines voies de signalisation avec une expression plus élevée au niveau des micro-vaisseaux cérébraux (Bjorbaek et al. 1998), laissant entrevoir un rôle dans le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique. Les autres isoformes courtes (ObRc, ObRd et ObRf) sont moins exprimées que ObRa. L'ObRe étant circulante et sans domaine intracellulaire et membranaire, il s'agit d'une protéine de liaison ayant pour rôle principal la régulation des taux de leptine plasmatique et par conséquent de sa disponibilité biologique.

Sur le plan cardiovasculaire, la leptine agit en augmentant la fréquence cardiaque et la pression artérielle (Sato et al. 1999; Shek et al. 1998). Elle intervient aussi dans l'induction de l'hypertrophie cardiomyocytaire (Rajapurohitam et al. 2003). Cependant, bien qu'elle soit à première vue cardio-délétère, certaines études ont néanmoins montré que la leptine en plus de réduire la lipotoxicité (Y. Lee et al. 2001) et l'apoptose (Eguchi et al. 2008), était

capable d'assurer une cardioprotection faisant intervenir la voie de signalisation JAK/STAT (Smith et al. 2010) notamment suite à une séquence d'ischémie reperfusion.

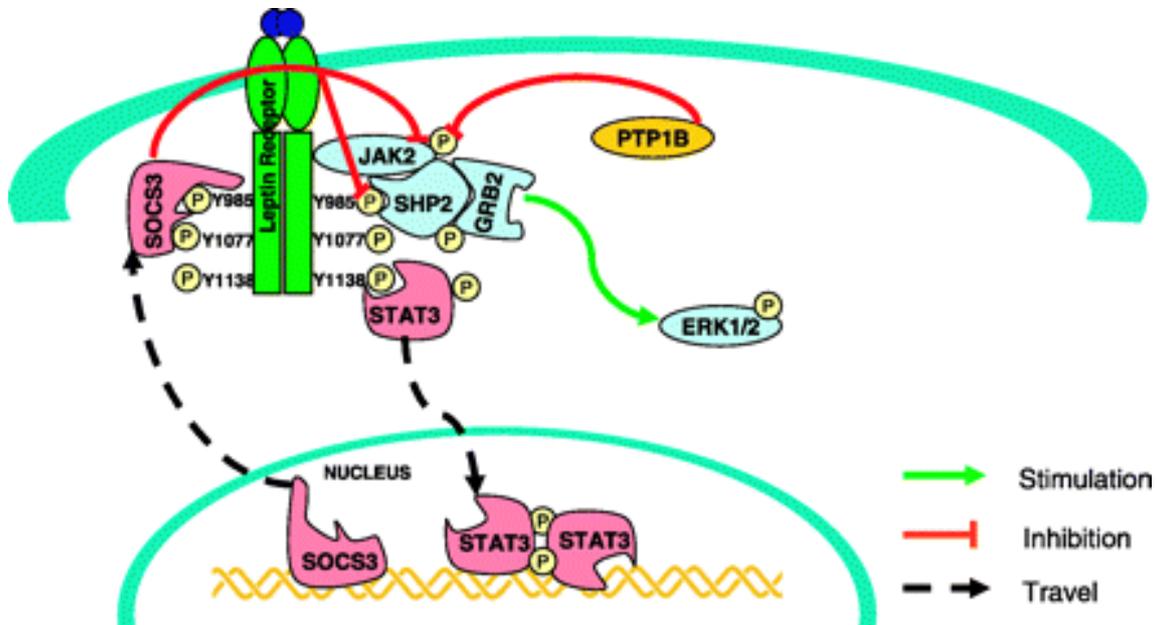


Figure 4 : Voie de signalisation du récepteur de la leptine.

La fixation de la leptine sur son récepteur induit une activation de JAK2 (Janus Kinase) qui active à son tour par phosphorylation STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) entraînant son homodimérisation et sa translocation nucléaire (R. Yang and Barouch 2007).

3.4.2. L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine de 30 kDa qui, comme la leptine, est sécrétée essentiellement par les adipocytes. Parfois appelée Acrp30 ("adipocyte complement-related protein of 30 kDa"), adipoQ chez la souris et GBP28 ("gelatin-binding protein 28") ou APM1 ("adipose most abundant gene transcript 1") chez l'homme, l'adiponectine est composée de 247 acides aminés chez la souris et de 244 acides aminés chez l'homme. Sa structure primaire possède deux régions importantes (type collagène à l'extrémité N-terminale et globulaire à l'extrémité C-terminale) et présente une homologie avec le facteur C1q du complément.

L'adiponectine circule dans le plasma sous forme de trimère et d'hexamère (forme de faible masse moléculaire, LWM) ou sous forme multimérique de 12 ou 18 sous unités (forme de haute masse moléculaire, HWM).

Chez l'homme, sa concentration plasmatique est de l'ordre de 5 à 30 µg/mL, mais, contrairement aux autres adipokines, celle-ci diminue chez le sujet obèse (Arita et al. 1999).

Les principaux tissus cibles de l'adiponectine sont les muscles striés, le foie, les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques. Il existe deux types de récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2. Ceux-ci comprennent 7 domaines transmembranaires avec une répartition différente ; en effet, AdipoR1 se trouve majoritairement dans les muscles squelettiques alors que AdipoR2 est majoritairement exprimé dans le foie. Récemment, certaines études ont identifié la présence de ces récepteurs au niveau du tissu cardiaque (Ding et al. 2007).

L'effet de l'adiponectine, passe principalement par l'activation de l'AMP Kinase (adenosine monophosphate-activated protein kinase).

Parmi ses différents effets physiologiques, l'adiponectine diminue les concentrations plasmatiques en acides gras et en triglycérides, ainsi que la production hépatique de glucose (Combs et al. 2004).

L'adiponectine semble également intervenir dans le phénomène inflammatoire en diminuant la concentration du TNF α plasmatique (Maeda et al. 2002). Elle diminue l'expression du TNF α et de l'IL-6 induite par le LPS dans les macrophages et les adipocytes (Ajuwon and Spurlock 2005), et à l'inverse, induit l'expression de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 (Wolf et al. 2004).

Son action s'étend également au système cardiovasculaire, en effet, il a été démontré qu'elle avait un effet bénéfique en réduisant la pression artérielle, les dommages cardiaques et l'hypertrophie induite par augmentation de la post-charge (Ohashi et al. 2006; Shibata et al. 2004). Elle a par ailleurs été démontrée comme étant une adipocytokine présentant un effet anti-athérogénique (Shimada et al. 2004).

Bien que la leptine et l'adiponectine soient les deux principales adipocytokines dont le rôle dans le système cardiovasculaire ait été caractérisé, il a été également décrit d'autres molécules bioactives pouvant intervenir dans ce système, et plus particulièrement l'apeline, la visfatine et la résistine.

3.4.3. L'apeline

Découverte en 1998, cette adipocytokine produite dans divers tissus tels que le cerveau, le rein, le foie, les poumons mais aussi dans les coronaires (De Falco et al. 2002; D. K. Lee et al. 2000), est le ligand endogène du récepteur orphelin APJ (Tatemoto et al. 1998). Cette hormone est issue d'une préproprotéine de 77 acides aminés subissant des clivages à différents niveaux en fonction du tissu (Kawamata et al. 2001).

La présence de l'apeline est très marquée dans le système nerveux central, notamment au niveau de l'hypothalamus et du bulbe rachidien, au sein de noyaux impliqués dans la prise alimentaire et hydrique (Reaux et al. 2002). Sur le plan vasculaire, l'apeline induit une

diminution significative de la pression artérielle (D. K. Lee et al. 2000), via une augmentation de la phosphorylation des eNOS (Tatemoto et al. 2001).

D'autres études ont montré l'implication de l'apeline dans les modifications de la fonction cardiaque avec un effet inotrope positif sur cœur isolé de rat (Szokodi et al. 2002). Son rôle cardioprotecteur, fait intervenir l'activation de la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) et de p44/42 MAPK (Mitogen-activated protein kinase). Ainsi, chez la souris, l'administration d'apeline au cours de la reperfusion induit une réduction significative de la taille de l'infarctus (Simpkin et al. 2007; Smith et al. 2007). Chez l'homme, les patients présentant une insuffisance cardiaque chronique présentent une diminution des taux plasmatiques d'apeline (Chong et al. 2006). D'autre part, il a été démontré une augmentation de la contractilité couplée à une augmentation du débit cardiaque après administration d'apeline sur des cœurs isolés perfusés de rat (Szokodi et al. 2002). De par ses actions sur le système cardiovasculaire, il a été proposé que l'apeline pourrait jouer un rôle dans le développement cardiaque (Scott et al. 2007). On peut aussi remarquer une plus forte expression du récepteur APJ dans le tissu cardiaque issu de rats nouveau-nés (Hosoya et al. 2000). Ceci suggère que le récepteur puisse jouer un rôle sur lors développement embryonnaire.

3.4.4. La visfatine

La visfatine est une adipocytokine de 52 kDa, produite principalement par le tissu adipeux intra-abdominal (Fukuhara et al. 2005). Une suggestion est alors apparue quant au fait que cette adipocytokine pourrait représenter un lien entre l'obésité abdominale et le diabète (Sethi and Vidal-Puig 2005).

Les propriétés métaboliques de la visfatine sont caractérisées par l'augmentation du transport glucidique et de la lipogenèse accompagnée d'une diminution de la production de glucose par les hépatocytes (Fukuhara et al. 2005). Elle apparaît donc comme étant une hormone hypoglycémiante, même si son effet est moindre comparativement à celui de l'insuline. Il a été démontré chez les souris diabétiques, qu'une administration de visfatine améliorait la sensibilité à l'insuline permettant ainsi une baisse à la fois de la glycémie et de l'insulinémie (Fukuhara et al. 2005). En d'autres termes, cette hormone peut être considérée comme étant une hormone « anti-diabétique » par son effet insulino-mimétique. En effet, elle active la transduction du signal de l'insuline en se fixant sur son récepteur de manière non compétitive (Sethi and Vidal-Puig 2005). Cependant, l'élévation brutale de visfatine dans le tissu adipeux viscéral des souris obèses révèle un rôle potentiel dans la physiopathologie de l'obésité voire dans le syndrome métabolique. De manière intéressante, la visfatine est localisée également dans les régions athéromateuses suggérant un rôle dans le processus inflammatoire (Dahl et al. 2007). Cette hormone exerce par ailleurs un effet cardioprotecteur

chez la souris, en réduisant considérablement de l'ordre de 50 % la taille de l'infarctus (Lim et al. 2008), cet effet bénéfique passant par un retard de l'ouverture du MPTP (Mitochondrial permeability transition pore) induit par le stress oxydant (Lim et al. 2008).

3.4.5. La résistine

Constituée de 114 acides aminés, cette adipocytokine est aussi produite dans d'autres tissus que le tissu adipeux tels que le poumon, le pancréas et le placenta (Minn et al. 2003) (Yura et al. 2003). Sa concentration plasmatique est corrélée à l'insulinoresistance aussi bien chez les sujets obèses que non-obèses (Silha et al. 2003). Son appellation dérive du fait qu'elle induit une résistance à l'insuline en annihilant la signalisation passant par le récepteur à l'insuline (Kusminski et al. 2005), réduisant par voie de conséquence l'entrée de glucose dans la cellule, y compris dans les cellules cardiaques. Weikert *et coll.* (Weikert et al. 2008) ont mis en évidence l'élévation du taux plasmatique de résistine lors d'un infarctus du myocarde, la plaçant ainsi comme un bon marqueur diagnostique potentiel de la survenue d'infarctus du myocarde. L'augmentation de sa concentration plasmatique a également été observée lors d'une insuffisance cardiaque, ce qui renforce son rôle non négligeable dans la physiopathologie cardiovasculaire (Frankel et al. 2009). De plus, cette hormone accentue les dommages cardiaques liés à une séquence d'ischémie-reperfusion, en contrebalançant les effets bénéfiques de certains agents cardio-protecteurs tels que l'insuline (Hausenloy and Yellon 2009).

4. Causes du surpoids

4.1. Facteurs génétiques

Les avancées scientifiques récentes ont permis de mieux comprendre la part imputable à la génétique dans l'augmentation de la masse adipeuse. Des études épidémiologiques ont montré que la prévalence de l'obésité faisant suite à un surpoids était environ 4 fois plus élevée au sein de familles d'individus obèses que dans l'ensemble de la population, mettant ainsi en évidence une part d'ordre génétique dans le développement du tissu adipeux (Bouchard 1996).

On estime environ à 300 le nombre de gènes ou de loci impliqués dans le développement de l'obésité ; cependant, très peu d'entre eux ont montré une implication causale réelle dans la mise en place de cette pathologie. Il existe des formes rares, dites monogéniques, pour lesquelles l'obésité est le résultat d'une mutation au sein d'un gène donné. A ce jour, seulement 36 cas impliquant des mutations au sein de 6 gènes différents ont été recensés : gènes de la pro-hormone convertase-1 (PCSK1, 1 cas), de la leptine (LEP, 6 cas), du

récepteur de la leptine (LEPR, 3 cas), de la pro-opiomélanocortine (POMC, 2 cas), du récepteur aux mélanocortines de type 4 (MC4R, 73 cas) et du gène SIM1 (single-minded homolog 1). Il faut noter que ces formes monogéniques ne font intervenir aucune interaction avec l'environnement contrairement aux cas les plus généraux correspondant à une obésité multifactorielle polygénique faisant intervenir des gènes à variant fréquents, à petits effets.

4.2. Facteurs endocriniens

Un dérèglement hormonal peut être à l'origine du développement d'un surpoids suivi d'une obésité. Un gain de poids peut être observé lors d'une hypothyroïdie, principalement chez la femme. L'hypercorticisme (syndrome de Cushing) est également associé à une apparition d'un surpoids et d'une obésité chronique au même titre que l'hyperinsulinémie associée à une insulino-résistance. Il existe également une corrélation inverse entre la GH (growth hormone) et l'IMC mais la prise de masse corporelle n'est pas liée à un gain d'adiposité.

4.3. Facteurs environnementaux précoces

Les facteurs environnementaux jouent un rôle prépondérant dans l'augmentation de la prévalence du surpoids. Celui-ci peut résulter d'une augmentation du comportement sédentaire lié à une diminution de l'activité physique, mais aussi dans les pays industrialisés, à une plus grande accessibilité et une abondance alimentaire.

Outre les facteurs liés à l'environnement général, l'environnement *in utero* intervient de manière importante dans le développement du surpoids. Il y a une vingtaine d'années, une étude a montré qu'une sous-nutrition au cours de la grossesse entraînait une reprogrammation du métabolisme fœtal avec une mise en place d'une insulino-résistance et d'un retard de croissance (Barker 1990).

Cette étude est à l'origine de l'hypothèse d'une cause précoce des maladies chroniques à l'âge adulte proposée par Barker, démontrant qu'une sous-alimentation fœtale augmente le risque de survenue d'un surpoids associé à une incidence plus fréquente des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (Barker and Osmond 1986). Cette hypothèse fut ainsi la pierre angulaire d'autres études s'intéressant à l'impact de perturbationq environnementaleq et nutritionnelleq sur le développement ultérieur de pathologies.

Ainsi, 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. Il reste aujourd'hui la première cause de macrosomie fœtale (poids à la naissance supérieur à 4 kg). Un retard de croissance intra-utérin (RCIU) peut aussi paradoxalement, suite à un rattrapage de poids

rapide après la naissance (catch-up growth), engendrer un surpoids voire une obésité à l'âge adulte.

Or, si l'environnement utérin joue un rôle majeur dans l'orientation métabolique ultérieure de l'individu, à un moment où il existe chez le fœtus une très grande plasticité génique, la période post-natale constitue aussi un moment critique où des changements nutritionnels sont susceptibles d'influencer à long terme la survenue de pathologies associées au surpoids.

5. La suralimentation postnatale

Juste après la naissance, et durant toute la période dite de la jeune enfance, l'organisme entre dans une phase où il doit s'adapter à la fois à l'environnement physique et à l'environnement nutritionnel, si bien qu'un déséquilibre alimentaire dès les premiers stades de la vie peut avoir des conséquences majeures sur le développement ultérieur de l'enfant.

C'est en 1976, qu'une étude a montré qu'une suralimentation postnatale chez l'homme, notamment durant le premier trimestre de la vie, pouvait être considérée comme un facteur de risque conduisant au développement de l'obésité et de ses complications (Dorner et al. 1976).

Dans le même esprit, plusieurs travaux ont essayé de déterminer l'influence de l'allaitement maternel, qui induit un risque inférieur de surnutrition par rapport aux laits maternisés, sur le développement de l'obésité. De fait, l'étude épidémiologique de Von Kries et coll. en 1999 (von Kries et al. 1999) sur 9357 enfants en Bavière, a montré que plus la durée de l'allaitement était longue, moins les enfants présentaient de risque d'être en surpoids à l'âge adulte. Une autre étude est venue étayer ces travaux sur l'importance que représente la période pré-adulte dans le développement du tissu adipeux, en démontrant que le nombre d'adipocytes à l'âge adulte est déterminé dès l'enfance et l'adolescence (Spalding et al. 2008).

Afin de mieux comprendre et d'étudier l'effet d'une suralimentation postnatale, un modèle animal a été établi, reposant sur la réduction des portées juste après la naissance. Plagemann *et coll.* ont montré que, chez le rat, réduire le nombre de petits à la naissance (portée de 3 à 4 rats par mère) induisait une augmentation significative du poids corporel (Plagemann et al. 1992) accompagnée d'une augmentation de la consommation de nourriture (Voits et al. 1996) par rapport à la portée contrôle comprenant un nombre de 12 rats. Cette suralimentation postnatale peut conduire, outre à un surpoids, à une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose, une augmentation des triglycérides et parfois du niveau de la pression artérielle (Plagemann et al. 1999). Ainsi, plusieurs études ont tendu

à démontrer qu'une modification de l'environnement hormonal et nutritionnel durant la période néonatale conduit à une prédisposition vis-à-vis du développement de plusieurs maladies à l'âge adulte avec une mise en place éventuelle du syndrome métabolique (Boullu-Ciocca et al. 2005).

Etant donné que la prise de poids passe principalement par une surconsommation de nourriture, des études se sont intéressées à l'axe hypothalamique régulant la prise alimentaire. Il a été ainsi démontré une augmentation du nombre de neurones à galanine (Plagemann et al. 1999), peptide de 29 acides aminés considéré comme un stimulateur de la prise alimentaire (Tatemoto et al. 1983). D'autres neuropeptides sont également impliqués dans l'hyperphagie observée chez les animaux suralimentés juste après la naissance. Le neuropeptide Y (NPY) et l'AGRT (agouti related transcript) sont responsables en partie du phénotype de surpoids chez ces animaux (Lopez et al. 2005). La leptine, qui est une hormone anorexigène, agit au niveau hypothalamique via son récepteur Ob-Rb qui va inhiber la réponse induite par les neuropeptides orexigènes tels que le NPY et l'AGRT (Meister 2000). Bien qu'une hyperleptinémie soit observée chez les animaux suralimentés, il semblerait qu'il y ait une instauration d'une résistance à la leptine au niveau central. Cette résistance à la leptine induite par la suralimentation postnatale est corroborée par la réduction de l'expression du récepteur Ob-Rb hypothalamique chez ces mêmes animaux.

Sur le plan métabolique, l'insuline joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie glucidique en stimulant l'incorporation du glucose dans les cellules, principalement les cellules musculaires et les adipocytes. Rodrigues *et coll.*, ont démontré que les rats suralimentés présentaient à l'âge adulte une baisse du transport du glucose intracellulaire au niveau des adipocytes (Rodrigues et al. 2007). Cette baisse de la réponse à l'insuline résulte d'une diminution significative de l'expression de gènes codant pour des protéines intervenant dans la voie de signalisation de l'insuline telles que : IRS-1 (insulin receptor substrate 1), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Akt et GLUT-4 (glucose transporter 4). La production d'insuline par les îlots pancréatiques peut également être affectée par la suralimentation postnatale conduisant à une diminution de la libération d'insuline après stimulation par le glucose (Waterland and Garza 2002).

Aujourd'hui, on sait que la masse musculaire est une des composantes majeures de l'absorption du glucose médiée par l'insuline, si bien qu'une perte de cette masse peut être associée à un dérèglement métabolique. Une étude réalisée par Woo *et coll.*, a montré l'implication de la suralimentation postnatale sur le nombre de cellules souches musculaires (Woo et al. 2011). Ainsi, la baisse du nombre de cellules souches musculaires pourrait aussi contribuer au développement de perturbations métaboliques à l'âge adulte.

Cette relation, décrite au niveau métabolique et central s'applique également au fonctionnement de plusieurs autres organes. Ainsi, des travaux ont montré une dysfonction

rénale avec une augmentation de la glomérulosclérose chez les rats mâles suralimentés (Boubred et al. 2007; Boubred et al. 2009). Ces observations ont été complétées par les travaux de Yim *et coll.*, montrant que la suralimentation postnatale, chez les rats, induit une dysrégulation du système rénine-angiotensine (SRA) avec une augmentation du taux d'expression de la rénine et du récepteur de type 2 à l'angiotensine (AT2) au niveau des tubules rénaux (Yim et al. 2011). Le SRA a un rôle important dans la croissance et la maturation rénale durant la période néonatale (Chen et al. 2004). L'activation du SRA est associée à une augmentation de la réabsorption sodée entraînant une augmentation de la volémie et par conséquent celle de la pression artérielle. De plus, dans la littérature, il est décrit que l'hyperleptinémie peut influencer de manière conséquente les fonctions rénales à travers une hyperactivité sympathique et une baisse de l'excrétion sodique aboutissant à une plus grande rétention hydro-sodée passant principalement par une augmentation de l'activité des pompes Na^+/K^+ ATPase (Beltowski et al. 2004).

Toujours dans ce modèle de surpoids, des travaux ont montré une exacerbation de la réponse au LPS chez les rats suralimentés avec une augmentation de l'expression des récepteurs toll-like (TLR) 2 et 4 dans le tissu adipeux. Les concentrations des cytokines pro-inflammatoires plasmatiques sont également augmentées de manière significative chez ces mêmes animaux (Clarke et al. 2011).

Ces données renforcent l'hypothèse d'effets délétères de la suralimentation en période néonatale sur le développement à long terme d'anomalies de l'équilibre métabolique et inflammatoire, pouvant conduire à des altérations fonctionnelles touchant plusieurs organes.

6. Le syndrome métabolique

Le terme de syndrome métabolique, proposé par Reaven en 1988, correspond à une relation entre périmètre abdominal, intolérance au glucose, insulino-résistance, hypertriglycéridémie et élévation de la pression artérielle (Reaven 1988).

De nombreuses définitions ont été données à ce syndrome, avec des différences de seuil glycémique, lipidique, du tour de taille et de la pression artérielle. Aujourd'hui, la définition 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 systolique > 130 mmHg et pression artérielle diastolique > 85 mmHg

La prévalence du syndrome métabolique ne cesse de croître dans les pays industrialisés. L'étude NHANES III (Third National Health And Nutrition Examination Survey) a révélé que 20 à 30 % des adultes vivant sur le territoire américain présentaient un syndrome métabolique. Bien que les chiffres concernant la France restent plus bas que ceux obtenus aux Etats-Unis, ils ne sont néanmoins pas négligeables comme le souligne l'étude DESIR montrant qu'environ 11,7 % des hommes et 7,5 % des femmes sont atteints de syndrome métabolique.

En 2006, Reaven explique que l'association obésité abdominale et insulino-résistance serait responsable de la mise en place d'un syndrome métabolique et favoriserait l'apparition des autres facteurs (Reaven 2006) (Carr et al. 2004). Cette explication repose sur plusieurs études mettant en lumière une corrélation positive entre le taux d'insuline, la pression artérielle et les autres paramètres métaboliques (Modan et al. 1985) (Carantoni et al. 1998). Bien qu'une part indiscutable revienne à la génétique dans la mise en place de ce syndrome, elle reste toutefois mineure face à celle impliquant le style de vie, la sédentarité et l'alimentation.

7. Surpoids et anomalies métaboliques

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

7.1. 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 lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont chargées de transporter les lipides dans l'organisme (tableau 1). Le bilan lipidique tient compte des concentrations de cholestérol total, de triglycérides, du HDL-cholestérol du LDL-cholestérol.

On parle de dyslipidémie lorsque :

- le taux de LDL-cholestérol est supérieur à 1,6 g/l

- le taux de HDL-cholestérol est inférieur à 0,4 g/l
- le taux de triglycérides est supérieur à 1,5 g/l

L'effet de la prise de poids sur la lipidémie se traduit par une élévation des taux de triglycérides et de LDL (low density lipoprotein), structures impliquées dans le transport du cholestérol vers les tissus périphériques. Ces augmentations sont associées à une baisse du cholestérol contenu dans les HDL (high density lipoprotein) (Denke et al. 1993) (Lamon-Fava et al. 1996) (Pou et al. 2007), structures à leur tour responsables du transport inverse du cholestérol des tissus vers le foie.

Aujourd'hui, le ratio cholestérol total/HDL-cholestérol apparaît comme étant un facteur prédictif robuste quant à la survenue de maladies cardiovasculaires (Di Angelantonio et al. 2009) (Kastelein et al. 2008). Il est intéressant de noter que ce rapport, appelé également indice d'athérogénicité, augmente avec l'IMC (Marsh 2003) alors que, le cholestérol total quant à lui tend vers un plateau au-delà d'un IMC de 30.

À la lumière de ces résultats, l'augmentation de la masse graisseuse semble jouer un rôle prépondérant sur la dysrégulation du métabolisme lipidique, si bien qu'une baisse même modérée de cette masse adipeuse permettrait de rétablir un profil lipidique se rapprochant des valeurs physiologiques (Pelkman et al. 2004).

7.2. Insulinorésistance

L'insulinorésistance est un état 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 tissu adipeux. Cette altération métabolique précède le plus souvent le diabète de type II, qui se développe plus fréquemment chez les sujets en surpoids (Field et al. 2001; Mokdad et al. 2000). L'insulinorésistance se caractérise par la mise en place d'une hyperglycémie, 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.

7.2.1. Au niveau musculaire squelettique

Sur le plan musculaire, l'insulinorésistance résulte d'un déficit de stockage du glucose sous forme de glycogène par la glycogène synthase (Petersen and Shulman 2002). L'entrée de glucose dans l'espace intracellulaire se fait en partie par des transporteurs appelés GLUT (GLUT-1 à GLUT-7), mais dans le muscle squelettique, l'insuline induit un recrutement transmembranaire du transporteur GLUT-4 (Bryant et al. 2002; Chang et al. 2004; Saltiel and Kahn 2001). Il a été démontré chez les personnes en surpoids présentant une résistance à l'insuline, un défaut de localisation subcellulaire de GLUT-4 (Garvey et al. 1998) et une déficience de l'action de translocation de l'insuline (DeFronzo 1988b, 1988a; Shepherd and Kahn 1999).

7.2.2. Au niveau hépatique

Au niveau hépatique, l'insuline agit en inhibant la néoglucogenèse et la glycogénolyse tout en favorisant le stockage de glucose sous forme de glycogène (Boden 2004). Chez les sujets diabétiques, on constate une baisse de l'efficacité de l'insuline au niveau hépatique conduisant à un excès de production de glucose. En outre, l'insulinorésistance se traduit aussi par une dérégulation de la synthèse et du stockage hépatique des triglycérides. Les personnes atteintes de syndrome métabolique et/ou de diabète de type 2 présentent des taux élevés d'acides gras libres au niveau hépatique en raison d'une diminution de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production et la sécrétion des VLDL (Very Low Density Lipoprotein, composées principalement de triglycérides) (Taghibiglou et al. 2000) (Kraegen et al. 2001). De plus, l'action de la LPL (Lipoprotéine Lipase) chargée d'hydrolyser les triglycérides contenus dans les VLDL est diminuée chez les sujets obèses (Taskinen et al. 1982).

7.2.3. Au niveau du tissu adipeux

La translocation du transporteur GLUT-4 décrite dans les cellules musculaires squelettiques responsable du transport du glucose dans le cytoplasme se retrouve également au niveau des adipocytes (Saltiel and Kahn 2001). Une augmentation de l'expression des ARNm de GLUT4 est induite par l'insuline (Hernandez et al. 2003; Valverde et al. 1999). En conditions physiologiques, l'insuline exerce un effet anti-lipolytique sur le tissu adipeux, mais dans le cas du diabète de type II, où l'on observe une résistance à l'action de l'insuline, il se produit une augmentation de la libération d'acides gras libres dans le secteur plasmatique (Verges

2005) faisant intervenir la lipase hormono-sensible (LHS) dont l'expression est diminuée chez les individus obèses (Jocken et al. 2007).

Cependant, cette perte de sensibilité à l'insuline peut être réversible chez les sujets obèses après diminution de leur quantité de tissu adipeux à la suite d'exercices physiques ou d'une restriction calorique (Coker et al. 2009).

8. Le surpoids et les maladies cardiovasculaires

Il est très largement admis que le surpoids et l'obésité sont des facteurs de risque impliqués dans l'initiation et le développement de pathologies cardiovasculaires (hypertension artérielle, coronaropathies, hypertrophie ventriculaire gauche, insuffisances cardiaques).

Chez les sujets obèses, le tissu adipeux joue un rôle prépondérant dans l'installation de la dysfonction endothéliale (Hutley and Prins 2005) et des atteintes coronaires (Galili et al. 2007). L'augmentation de la graisse péri-vasculaire induit une production accrue de cytokines accentuant le processus inflammatoire, facteur essentiel au développement de l'athérosclérose (Gustafson 2010). Des données épidémiologiques issues notamment de l'étude Framingham Heart Study ont révélé une augmentation du risque d'insuffisance cardiaque associée à l'indice de masse corporelle (IMC).

La prévalence de l'hypertension artérielle (HTA) s'accroît également avec l'augmentation de la masse adipeuse (Garrison et al. 1987; Kannel et al. 1967; Timpson et al. 2009). Plusieurs explications peuvent être apportées quant au développement de l'HTA chez le sujet en surpoids. Parmi elles, la déficience en adiponectine observée chez les sujets présentant un IMC supérieur à 25 (Arita et al. 1999; Kadowaki et al. 2003), pourrait moduler le tonus vasculaire, car l'adiponectine a la capacité de stimuler la NOS3 (Nitric Oxide Synthase) des cellules endothéliales (Z. V. Wang and Scherer 2008). En outre, l'augmentation du tissu adipeux s'accompagne d'une majoration du système rénine angiotensine aldostérone, impliqué dans la genèse de l'HTA, par augmentation de l'angiotensinogène plasmatique (Umemura et al. 1997; Yasue et al. 2010).

Cette hypertension artérielle, au même titre qu'une dyslipidémie et qu'un diabète de type 2 peut constituer chez les personnes présentant une surcharge pondérale associée principalement à une adiposité centrale, un lit favorisant le développement de l'insuffisance coronaire et cardiaque.

L'HTA favorise le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) dont la prévalence est 6 fois plus élevée chez les individus en surpoids que chez les sujets normopondérés (de Simone et al. 2002), et peut conduire à terme à une insuffisance cardiaque congestive.

Chez les personnes en surpoids, afin de faire face à l'augmentation de la masse corporelle, le débit cardiaque augmente. Cette augmentation à la fois du débit cardiaque et de la volémie peut être à l'origine d'une insuffisance cardiaque (insuffisance cardiaque à débit élevée) ; il s'en suit une dilatation des cavités ventriculaires (Kenchaiah et al. 2002; Rider et al. 2011).

Grâce à la technique de l'échocardiographie, plusieurs altérations des paramètres cardiaques associées à la surcharge pondérale ont pu être évaluées. Ainsi, il a été constaté une diminution des vitesses de remplissage ventriculaire gauche, synonyme d'une dysfonction diastolique. Cependant, la fonction systolique (fractions d'éjection et de raccourcissement) ne semble pas être très affectée par la prise de poids et ceci même chez des individus présentant une obésité prononcée (Haass et al. 2011; Rider et al. 2011) avec parfois un effet inverse (Di Bello et al. 2006). Cette inversion peut s'expliquer par l'augmentation de la volémie et de la précharge chez les sujets obèses, activant ainsi le mécanisme décrit par Franck-Starling, où la force de contraction augmente avec la précharge (degré d'étirement).

D'autres données de l'étude Framingham ont également montré que les sujets présentant un IMC supérieur à la normale avaient de 45 à 50 % de plus de risque de développer des arythmies et ce, indépendamment des autres facteurs de risques cardiovasculaires (Messerli 1986; T. J. Wang et al. 2004).

Bien que l'IMC soit souvent associé aux maladies cardiovasculaires, il est important de souligner que le facteur prépondérant est l'adiposité dite centrale par rapport à l'IMC et ce même en cas de faible surpoids (Coutinho et al. 2011; Melanson et al. 2001; Trayhurn and Beattie 2001).

A travers toutes ces études, il apparaît clairement une implication du tissu adipeux dans les complications cardiovasculaires, plus ou moins fréquentes selon le degré d'obésité, telles que la dysfonction endothéliale, l'hypertension artérielle, l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG), la dysfonction ventriculaire et l'insuffisance cardiaque (Wong et al. 2004).

Le surpoids devient alors l'un des facteurs de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires ; de plus, la prise de poids est corrélée à une augmentation du niveau de stress oxydant (Keaney et al. 2003) pouvant renforcer le développement des pathologies cardiovasculaires.

9. Le surpoids et le stress oxydant

Des études aussi bien épidémiologiques qu'expérimentales ont mis en évidence un lien étroit entre l'obésité et l'augmentation du niveau de stress oxydant circulant (Keaney et al. 2003;

Suzuki et al. 2003), mais également entre le simple surpoids et l'augmentation de la production de molécules pro-oxydantes (Pou et al. 2007) : ainsi, les taux d'isoprostanes, métabolites de la peroxydation lipidique, et de myeloperoxydase, enzyme pro-oxydante, augmentent parallèlement avec l'indice de masse corporelle (Pou et al. 2007).

Ces résultats suggèrent que le tissu adipeux est capable de produire des ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène). En effet, les NADPH oxydases (enzymes pro-oxydantes) sont présentes sur la membrane des adipocytes (Krieger-Brauer et al. 1997), et produisent des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent être responsables de l'oxydation des lipides constituant les membranes, notamment des acides gras polyinsaturés. Cette augmentation de la production d'ERO peut en outre s'accompagner d'une diminution des défenses antioxydantes représentées par des enzymes telles que : Cu,Zn-SOD (Cuivre, Zinc-Superoxyde dismutase), GPx (Gluthation peroxydase), et catalases (Furukawa et al. 2004).

Outre des effets directs des adipocytes dans la production d'ERO, certaines adipokines sécrétées par le tissu adipeux peuvent initier une production d'ERO. Ainsi, la leptine est susceptible d'augmenter le niveau de stress oxydant vasculaire en induisant, via l'activation de la protéine kinase A, la production d'anion superoxyde mitochondrial (Yamagishi et al. 2001). Chez le rat, l'administration de leptine diminue les activités de PON1 (paraxonase-1) et de PAF-AH (platelet activating factor-acetylhydrolase), enzymes antioxydantes contenues dans les lipoprotéines.

Bien que le surpoids et l'obésité soient souvent associés à une perturbation du métabolisme et principalement à une modification du profil lipidique, ils jouent également un rôle important dans l'intensification du phénomène oxydant. Différentes études ont permis de mettre en évidence un lien existant entre certaines pathologies métaboliques et le stress oxydant (Urakawa et al. 2003). Ces observations ont été par la suite confirmées et enrichies par des résultats montrant un déclenchement potentiel d'une résistance à l'insuline par les ERO (Matsuzawa-Nagata et al. 2008).

Il faut maintenant décrire de manière plus précise et approfondie ce que l'on entend par la définition de « stress oxydant ».

II. Stress oxydant

1. Définition

Au sein des systèmes biologiques, un déséquilibre entre des systèmes oxydants et antioxydants en faveur des pro-oxydants peut survenir, conduisant à ce que l'on appelle communément le stress oxydant. Il résulte des processus d'oxydo-réduction mettant en jeu l'oxygène, et conduit à la production excessive d'intermédiaires réactionnels appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO). Parmi les ERO, certaines espèces appelées radicaux à électron libre ou « radicaux libres » se caractérisent par un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe, ce qui leur confère une certaine instabilité. En effet ces radicaux libres cherchent à appairer leur électron célibataire en réagissant avec de nombreuses molécules de leur environnement, provoquant des dommages cellulaires en chaîne. Le plus connu de ces radicaux libres de l'oxygène est sans doute l'anion superoxyde, issu de la réduction monovalente du dioxygène.

Bien que les espèces radicalaires soient généralement tenues pour responsables d'effets délétères dans la cellule, certaines molécules non-radicalaires présentent également une activité oxydante significative, parmi lesquelles le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le peroxyde d'azote (ONOO⁻) ou l'acide hypochloreux (HClO). Le stress oxydant est défini en ce sens comme un déséquilibre en faveur d'un excès de molécules pro-oxydantes aux conséquences néfastes, induisant des altérations biochimiques intracellulaires, telles que l'oxydation des lipides, des protéines (Pamplona et al. 2000) (Levine 2002) ou encore l'oxydation de l'ADN (Lass et al. 1998).

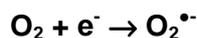
Parmi les « espèces réactives de l'oxygène et de l'azote », certaines possédant une faible réactivité peuvent entrer dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs systèmes biologiques (Wolin 1996).

2. Les mécanismes pro-oxydants

2.1. Les radicaux libres de l'oxygène et de l'azote

2.1.1. L'anion superoxyde (O₂^{•-})

L'anion superoxyde, O₂^{•-}, est un radical anion à électron libre. Il est plus réactif et plus instable que la molécule de dioxygène avec une demi-vie de l'ordre de 10⁻⁶ secondes, et résulte de la réduction monovalente du dioxygène.



Cet électron provient principalement de la « fuite » au niveau de la chaîne de transport électronique de la membrane interne mitochondriale au niveau des complexes I et III (Chance et al. 1979) (Figure 5).

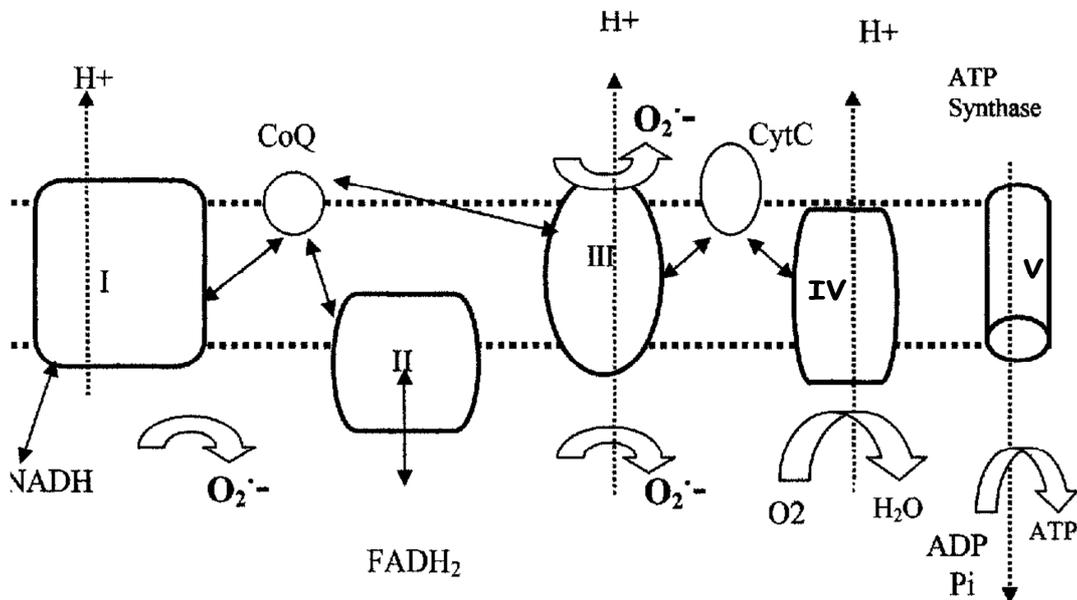
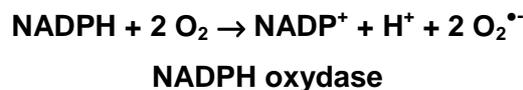


Figure 5 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Complexe I : NADH déshydrogenase, complexe II : succinate déshydrogenase, complexe III : cytochrome *bc1*, complexe IV : cytochrome *c* oxydase, complexe V : ATPase.

La formation d'O₂^{•-} peut aussi résulter de l'activité enzymatique de certains complexes protéiques tels que les NADPH oxydases selon la réaction suivante :



De par son électronégativité, l'anion superoxyde ne peut diffuser passivement à travers les membranes lipidiques cellulaires, et son transfert d'un compartiment à un autre ne peut se faire qu'au travers des canaux anioniques. L'anion superoxyde peut être converti en peroxyde d'hydrogène, beaucoup moins réactif, par dismutation spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases (SOD). De plus, il peut être transformé en anion peroxynitrite (ONOO⁻) suite à une interaction avec le monoxyde d'azote (NO).



2.1.2. Le radical hydroxyle (HO[•])

Les radicaux hydroxyles sont les radicaux libres de l'oxygène les plus réactifs qui puissent se produire dans le domaine biologique. Ils se forment à partir du peroxyde d'hydrogène selon deux processus. Le premier, lors de la réaction de Fenton, mettant en jeu le peroxyde d'hydrogène et des métaux de transition tels que le fer et le cuivre. Le deuxième processus de formation fait intervenir l'anion superoxyde selon la réaction dite d'Haber-Weiss.



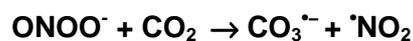
Sa faible diffusion et sa demi-vie très courte, de l'ordre de 10⁻⁹ secondes, font qu'il agit directement au niveau de son site de production. La quantité de production de ce radical en condition physiologique, reste néanmoins négligeable (Josephson et al. 1991).

2.1.3. Le monoxyde d'azote ([•]NO)

Le [•]NO est une molécule de signalisation ubiquitaire, dont la synthèse est sous la dépendance d'enzymes appelées NOS (Nitric Oxide Synthase), qui catalysent la conversion de la L-arginine en hydroxyarginine puis en L-citrulline et [•]NO (Palmer et al. 1988) selon la réaction suivante :



De par sa grande affinité pour le fer, le NO peut moduler l'activité de diverses enzymes à centre hémérique telles que la guanylate cyclase. Il peut également interagir comme nous l'avons noté précédemment avec l'anion superoxyde pour donner le peroxyde d'azote qui lui-même peut interagir avec le dioxyde de carbone (CO₂) pour former des radicaux carbonate (CO₃^{•-}) et dioxyde d'azote ([•]NO₂) qui peuvent à leur tour oxyder les protéines ou encore l'ADN (Szabo et al. 2007).



Le peroxyde d'azote peut aussi, après protonation, se décomposer en radical [•]OH et en radical dioxyde d'azote NO₂[•]. En présence d'oxygène, le NO est rapidement transformé en nitrite (NO₂⁻) puis en nitrate (NO₃⁻).

2.2. Les dérivés non radicalaires

2.2.1. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive oxygénée non chargée et non radicalaire. Le peroxyde d'hydrogène est, contrairement à l'anion superoxyde, plus stable et plus facilement diffusible vers d'autres cellules. Sa production passe principalement par la dismutation de l'anion superoxyde sous l'action des SOD. Bien que le peroxyde d'hydrogène soit moins réactif, il peut cependant générer des radicaux hydroxyle lorsqu'il est en présence de cations métalliques tels que le Fe²⁺ et le Cu⁺ (réaction de Fenton), et il peut être impliqué dans des mécanismes de peroxydation, notamment au niveau de lipides et en présence d'enzymes telles que les MPO (myéloperoxydases).

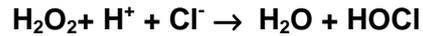
Sa neutralisation passe par deux systèmes enzymatiques, les glutathion peroxydases et les catalases. Alors que la catalase ne fait intervenir aucun cofacteur pour convertir le peroxyde d'hydrogène en eau, la glutathion peroxydase quant à elle utilise le glutathion réduit (Hamilton et al. 2004).

2.2.2. Peroxynitrite (ONOO⁻)

Le peroxynitrite résulte du couplage très rapide ($6,7 \times 10^{-9} \text{ M/s}^{-1}$) de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et du monoxyde d'azote ([•]NO) (Goldstein and Czapski 1995). Malgré sa demi-vie relativement courte (~10 ms), le peroxynitrite traverse facilement la membrane plasmique (Marla et al. 1997). Le ONOO⁻ peut soit interagir directement avec les composés biologiques au sein de la cellule, soit de manière indirecte. En effet, le peroxynitrite peut comme nous l'avons noté précédemment interagir avec le dioxyde de carbone. A pH physiologique, le peroxynitrite peut également se voir associer un proton, formant ainsi l'acide peroxynitreux (ONOOH) qui, suite à un clivage homolytique, peut générer de puissants oxydants. Le pouvoir oxydant de ces deux composés est hautement dépendant du pH. Tout comme le radical hydroxyle, en condition physiologique, le peroxynitrite est formé en quantité négligeable.

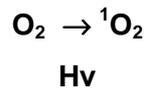
2.2.3. L'acide hypochloreux HOCl

L'acide hypochloreux est essentiellement produit à partir de peroxyde d'hydrogène et d'ion chlorure par les myéloperoxydases (MPO) selon la réaction suivante :



2.2.4. L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$

L'oxygène singulet très instable résulte de l'activation photochimique de l'oxygène :



Sa formation peut également être issue de la réaction mettant en jeu le peroxyde d'hydrogène et l'acide hypochloreux.



2.3. Sources génératrices d'espèces réactives

Au sein de la cellule, la production d'espèces radicalaires peut faire intervenir plusieurs processus à la fois enzymatiques et non enzymatiques. Les sources prépondérantes sont les suivantes :

2.3.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

Elle est la principale source d'énergie de la cellule grâce au transfert électronique via le coenzyme Q (ubiquinone) et le cytochrome C. Ce transfert est à l'origine de la production d'ATP par le complexe V mitochondrial. Des résultats issus d'expériences sur mitochondries isolées ont révélé qu'environ 2 à 3 % des électrons sont perdus par la chaîne respiratoire vont conduire à la formation d'anion superoxyde (Chance et al. 1979). En plus de produire des espèces radicalaires libérées dans la matrice interne, la mitochondrie possède également une capacité à produire des ERO sur la face externe de sa membrane externe, par oxydation des monoamines via l'oxydase membranaire de la monoamine (Ellis and Triggle 2003).

2.3.2. Les NADPH oxydases

Les NADPH oxydases sont des complexes enzymatiques multi-protéiques. C'est en 1964 que les NADPH oxydases ont été associées au « respiratory burst » (« flambée

respiratoire ») (Rossi and Zatti 1964) correspondant à une surconsommation d'oxygène durant la phagocytose. Depuis, d'autres études ont dénombré 6 homologues de la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase phagocytaire (gp91^{phox} ou NOX2) (NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2). Ces homologues sont retrouvés principalement dans le colon (NOX1), l'oreille interne (NOX3), vaisseau et rein (NOX4), tissu lymphoïde et testicules (NOX5) et thyroïde (DUOX1 et 2). Communément, il existe 3 sous-unités cytosoliques régulatrices (p47^{phox}, p67^{phox}, Rac-1), un complexe membranaire hétéromérique appelé cytochrome b558 formé de la sous-unité p22^{phox} et d'une sous-unité catalytique (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 ou DUOX2). Toutes ces isoformes catalysent le transfert d'électrons de son substrat, le NADPH, à l'accepteur final, l'oxygène, entraînant la production d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène (Bedard and Krause 2007).

2.3.3. Les NOS

Les NOS sont des protéines enzymatiques responsables de la synthèse du monoxyde d'azote (NO) résultant de la conversion de la L-arginine en L-citrulline. Il a été identifié 3 isoformes de NOS, appelés en fonction du tissu dans lequel elles ont été décrites : la nNOS (NOS neuronale ou NOS1), la iNOS (NOS inductible ou NOS2) et la eNOS (NOS endothéliale ou NOS3) (Alderton et al. 2001).

Leur structure se compose de deux domaines catalytiques ; un domaine N-terminal oxygénase et un domaine C-terminal réductase. Le domaine oxygénase contient des sites de liaison pour l'hème, la L-arginine et le cofacteur BH₄ (tétrahydrobioptérine). Le domaine réductase possède quant à lui un site de liaison pour la calmoduline, pour les flavines (FAD, FMN) et pour le NADPH (Figure 6) (Richards and Marletta 1994) (McMillan and Masters 1995) (Ghosh and Stuehr 1995).

Bien que les NOS soient principalement responsables de la production du NO, des travaux ont mis en évidence, notamment pour la eNOS, qu'elles étaient capables lorsque la biodisponibilité du substrat était faible ou que le cofacteur BH₄ était oxydé, de générer des quantités significatives d'anion superoxyde en transférant directement les électrons à l'oxygène (Vasquez-Vivar et al. 1998).

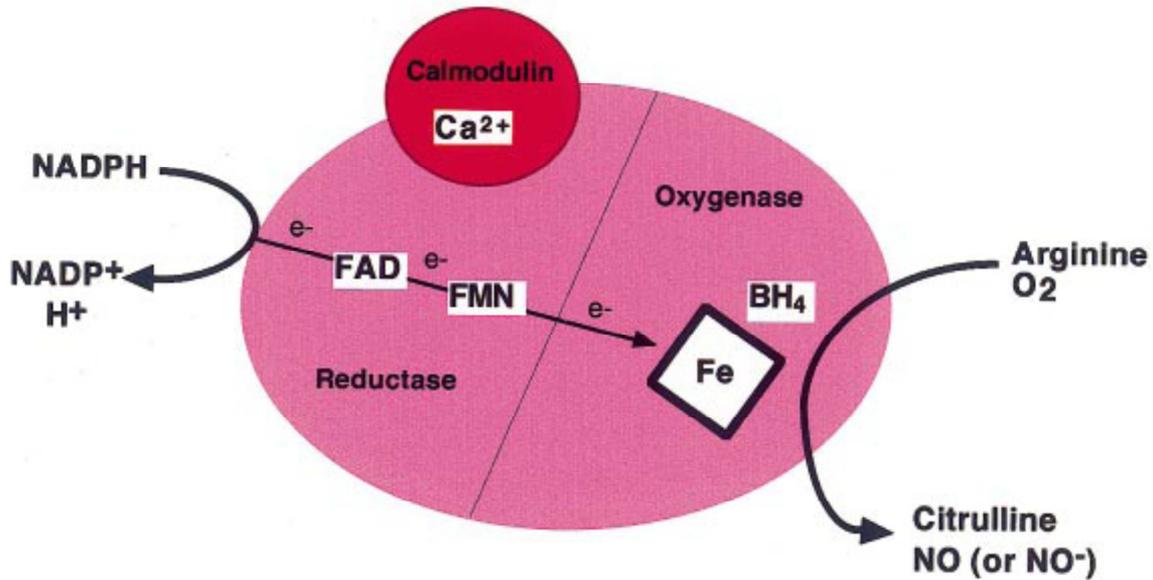


Figure 6 : Représentation schématique des différents co-facteurs et réactions catalysées par les NOS.

FAD : flavin adenine dinucleotide, FMN : flavin mononucleotide, Fe : fer (hémique), BH₄ : tetrahydrobioptérine.

2.3.4. Les xanthines oxydoréductases

Les xanthines oxydoréductases sont des protéines enzymatiques ubiquitaires catalysant la conversion de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique au cours du métabolisme des purines. Elles existent sous deux formes qui sont la xanthine déshydrogénase et la xanthine oxydase (Harrison 2002). La xanthine déshydrogénase peut être convertie en xanthine oxydase suite à une oxydation réversible du groupement sulfhydryl ou par modification protéolytique irréversible (Battelli and Lorenzoni 1982). Parmi ces deux formes, seule la xanthine oxydase est capable de générer l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène.

2.3.5. Les myéloperoxydases

Les myéloperoxydases (MPO) sont des enzymes hémiques appartenant à la famille des peroxydases de mammifères, qui comprend également la lactoperoxydase, l'éosinophile peroxydase, la peroxydase thyroïdienne et la prostaglandine H synthase (PGHS).

Elles sont exprimées dans les granules primaires des cellules polynucléaires neutrophiles et des monocytes. Les MPO possèdent une activité de peroxydase et de chloration. En effet, elles utilisent le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) afin de produire des composés oxydants. Elles peuvent en outre, catalyser l'oxydation à 2 électrons des ions Cl⁻ pour former l'acide

hypochloreux (HOCl) ; elles peuvent aussi utiliser les ions bromures ou iodures pour former les acides hypohalogénés correspondants. D'autres études ont rapporté que les MPO produisent également des composés très réactifs tels que $\bullet\text{Cl}$ ou Cl_2 , qui vont réagir avec d'autres substrats formant des composés très réactifs, comme le radical tyrosyle favorisant la réticulation des protéines (Heinecke et al. 1993) et à l'origine de lipoperoxydations (Podrez et al. 1999).

2.3.6. Les lipoxygénases

Les lipoxygénases sont des enzymes catalysant l'oxydation des acides gras polyinsaturés. Il existe plusieurs isoformes de lipoxygénases comme la 12/15-lipoxygénase (12/15-LO) et la 5-lipoxygénase (5-LO) qui sont les plus étudiés en raison de leur profil d'expression dans les cellules inflammatoires et endothéliales (L. Zhao and Funk 2004).

La 12/15-LO est retrouvée principalement dans le cerveau, les reins et les vaisseaux sanguins (Kuhn and O'Donnell 2006) ; et la 5-LO dans les macrophages, les cellules spumeuses et dendritiques (Lotzer et al. 2005). Ces lipoxygénases entrent dans la biosynthèse des leucotriènes issus de l'acide eicosatétraénoïque. Les espèces réactives à l'oxygène sont produites durant les étapes de biosynthèse des leucotriènes.

La lipoxygénase contribue également au même titre que les autres sources de production d'ERO au développement des maladies cardiovasculaires. Plusieurs résultats convergent en effet sur le lien existant entre la 12/15 lipoxygénase (12/15-LO) et l'athérosclérose (Cyrus et al. 1999; Cyrus et al. 2001). Une étude réalisée par Cipollone et coll., en 2005 démontre même l'implication de la deuxième isoforme de la lipoxygénase qui est la 5-lipoxygénase (5-LO) conduisant à une instabilité de la plaque (Cipollone et al. 2005).

2.3.7. L'auto-oxydation des molécules

Une des sources non négligeable d'ERO intracellulaires correspond à un processus d'auto-oxydation de certaines molécules, telles l'adrénaline, la dopamine, les flavines et les hydroquinones (Ceriello 1997; Misra et al. 2009).

2.3.8. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est également un lieu de production d'ERO. Il contient des enzymes dont le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et produit des ERO.

3. Les mécanismes antioxydants

3.1. Les enzymes

3.1.1. Les SOD (superoxydes dismutases)

Les SOD sont des métallo enzymes (Figure 7) catalysant la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène (Moumen et al. 1997). Il existe 4 types de superoxydes dismutases, selon les cofacteurs se fixant au niveau de leur site actif. Le site catalytique assure un puits hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l'anion superoxyde. La SOD à cuivre-zinc (CuZn-SOD) retrouvée au niveau du cytosol est un homodimère de 32 kDa interagissant principalement par des mécanismes hydrophobes et électrostatiques. Les atomes de Cu et Zn sont liés au niveau de l'histidine 61. Il existe également des CuZn-SOD tétramériques situés sur la face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCuZn-SOD) et les CuZn-SOD au niveau des liquides extracellulaires dont le plasma (pCuZn-SOD). Les SOD à manganèse (Mn-SOD) sont présentes dans les mitochondries et sont constituées d'un tétramère de 96 kDa. Il existe d'autres formes de SOD, à fer (Fe-SOD, tétramérique) et à nickel (Ni-SOD, homohexamérique), dont l'importance biologique est mineure.

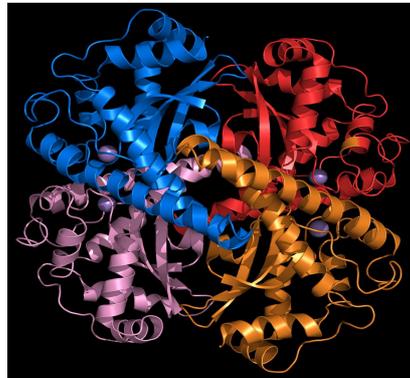
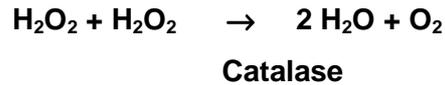


Figure 7 : Structure tridimensionnelle de la Mn-SOD humaine.

3.1.2. Les catalases

Les catalases sont également des enzymes catalysant une dismutation, celle du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène (Mates et al. 1999). Ces enzymes d'un poids moléculaire de 240 kDa sont composées de 4 tétramères portant chacun une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Les catalases sont majoritairement retrouvées dans le foie et les globules rouges.



3.1.3. Les glutathion peroxydases (GPx)

La famille des GPx comprend plusieurs isoformes contenant un atome de sélénium. La GPx cytosolique et mitochondriale, possède une structure tétramérique portant chacun un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine au niveau du site actif. Cette enzyme est chargée de réduire le glutathion oxydé en utilisant du NADPH comme donneur d'électrons. Elle tient une place importante dans la cellule dans la mesure où elle est chargée de la quasi-totalité de la conversion du peroxyde d'hydrogène en H₂O et O₂ (Figure 8).

La phospholipide hydroperoxyde GPx (HPGPx) réduit les peroxydes membranaires après action de la phospholipase A₂. Son pouvoir de réduction s'étend sur les acides gras hydroperoxydés, les phospholipides, les hydroperoxydes du cholestérol et les cholestérylesters au niveau des lipoprotéines et des membranes des globules rouges oxydés.

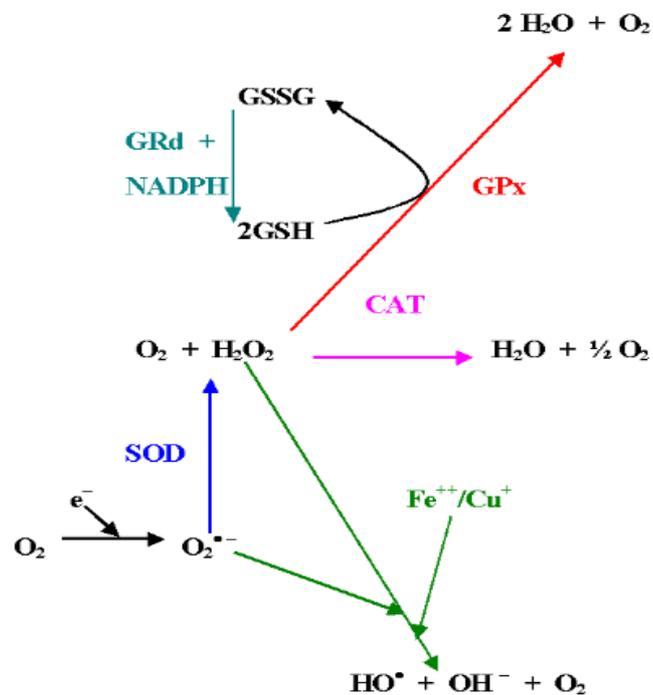


Figure 8 : Schéma représentant les interrelations entre les différentes enzymes antioxydantes.

3.1.4. La thiorédoxine

La thiorédoxine joue un rôle capital au sein des cellules dans la protection contre le stress oxydant en réduisant les protéines oxydées, dont celles impliquées dans la croissance cellulaire mais également les protéines intervenant dans les stades précoces du développement, si bien qu'une mutation du gène de la thiorédoxine (Trx) est létale dès le stade embryonnaire (Conrad et al. 2004).

3.2. Les molécules antioxydantes

3.2.1. La vitamine E

Les tocochromanols, plus connus sous le nom de vitamine E, sont des vitamines liposolubles. On appelle vitamine E les deux familles d'isomères qui sont les tocotriénols et les tocophérols. La différence entre ces deux familles se joue sur le degré d'insaturation de la chaîne latérale phytyle (Artur et al. 1994). Que ce soit pour les tocotriénols ou les tocophérols, il existe 4 formes α , β , γ et δ . Les formes α et γ sont cependant les formes majoritaires. Bien que toutes ces formes présentent une similitude en terme d'activité antioxydantes (Sen et al. 2006), elles présentent des activités vitaminiques différentes. En neutralisant les radicaux libres, l' α -tocophérol se transforme en tocophéryle-quinone moins réactif qui pourra à son tour être pris en charge par une autre molécule anti-oxydante. Son rôle est d'autant plus important qu'il se trouve dans les parties lipidiques de la cellule et des tissus. La vitamine E est ainsi le plus puissant agent antioxydant de la membrane cellulaire. Le gamma-tocophérol est encore plus efficace pour la protection radicalaire, capable de bloquer les espèces réactives de l'azote (Christen et al. 1997). Le mécanisme de régénération de la vitamine E implique principalement l'acide L-ascorbique (Figure 9). Cette régénération peut également faire appel aux couples oxydoréducteurs : radical semidéhydroascorbate/ascorbate, NADPH/NADP, GSH/GSSG, ubiquinol/semiubiquinone, acide dihydrolipoïque/acide lipoïque (Figure 10) agissant ainsi en synergie avec l'acide L-ascorbique.

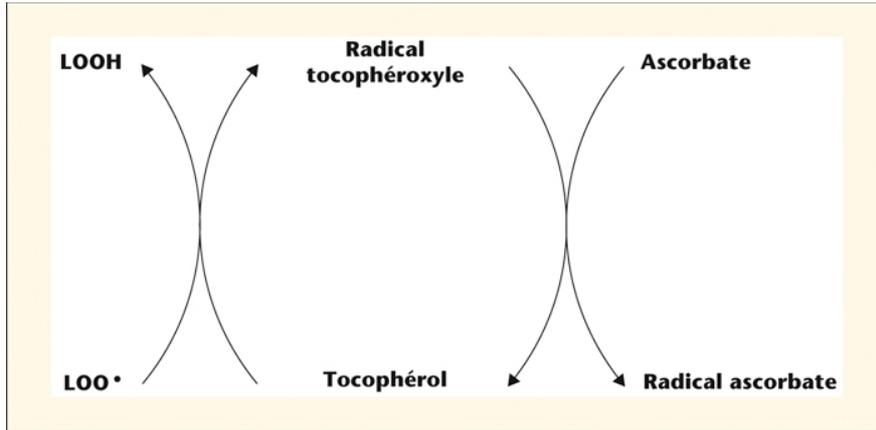


Figure 9 : Régénération de la vitamine E par l'acide ascorbique.

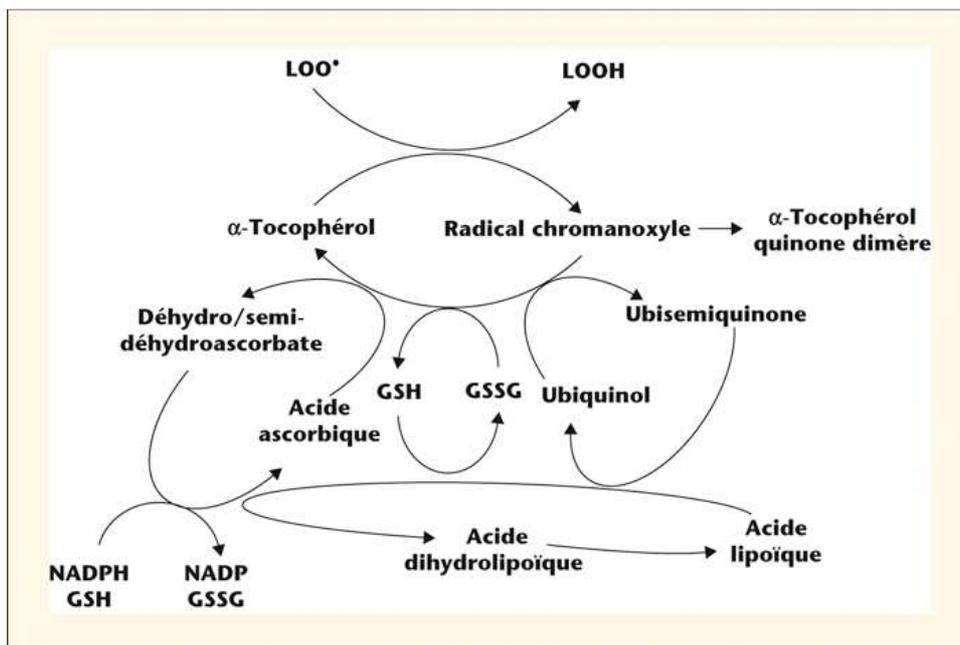


Figure 10 : Régénération de la vitamine E à partir de sa forme radicalaire et synergies probables entre différents couples oxydoréducteurs.

3.2.2. La vitamine C

La vitamine C (ou acide ascorbique) présente principalement sous forme ionisée à pH physiologique : L-ascorbate, possède une structure apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone de formule chimique $C_6H_8O_6$. L'ascorbate peut être oxydé en acide

mono-déhydroascorbique (MDHA) qui se dissocie rapidement en ascorbate et en déhydroascorbate (DHA). Le DHA est ensuite dégradé ou de nouveau réduit. Grâce à son potentiel redox, l'ascorbate peut céder un électron à n'importe quelle espèce oxydante se trouvant dans un environnement immédiat, tel que l'anion superoxyde et le radical hydroxyle. Elle est par ailleurs impliquée dans un grand nombre de réactions biologiques, dont la stimulation des défenses immunitaires, la synthèse du collagène et des catécholamines. Elle empêche également l'oxydation des LDL par des espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par des neutrophiles ou les cellules endothéliales activées. La forme oxydée (ou déhydro-ascorbate) passe par une forme intermédiaire (radical ascobyle) impliqué dans la régénération de la vitamine E (Niki et al. 1984).

3.2.3. Sélénium

Le sélénium appartient à la famille des chalcogènes ayant une forte tendance à former deux liaisons covalentes pour acquérir une couche saturée, afin de respecter la règle de l'octet. Le sélénium intervient dans la composition de la GPx, enzyme antioxydante intracellulaire. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxification des radicaux libres issus du métabolisme cellulaire.

3.2.4. Le zinc

Le zinc est un oligo-élément jouant un rôle de co-facteur pour certaines enzymes telles que la SOD. Cependant, il peut inhiber, dans une moindre mesure, les réactions de formations d'ERO induites par le cuivre ou le fer (Mezzetti et al. 1998). Il assure également la protection du groupement thiol des protéines.

3.3. Le stress oxydant et les dégâts cellulaires

Lors d'une dys-régulation du métabolisme de l'oxygène, les espèces réactives de l'oxygène sont produites d'une manière excessive induisant alors un état dit de stress oxydant dont nous avons décrit les caractéristiques précédemment. Ces espèces sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de lésions oxydatives au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...) pouvant affecter considérablement les mécanismes du maintien de l'homéostasie cellulaire.

3.3.1. Oxydation des lipides (peroxydation lipidique)

Les lipides membranaires sont les premières cibles des espèces réactives de l'oxygène. Leur sensibilité à l'oxydation est corrélée à leur degré d'insaturation (Pamplona et al. 2000). La peroxydation lipidique induit un mécanisme en chaîne de dégradation des acides gras au sein de la membrane, conduisant à la formation d'hydroperoxydes (ROOH) qui sont eux-mêmes instables et réactifs. D'autres produits sont formés au cours de ce processus d'oxydation lipidique : l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE). En outre, des études ont montré une dysfonction membranaire associée à cette peroxydation lipidique caractérisée par une diminution à la fois de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité membranaire (Hong et al. 2004). La supplémentation en vitamine E permet de réduire le niveau de peroxydation lipidique et de restaurer la fluidité membranaire (Hong et al. 2004).

3.3.2. Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines passe par l'ajout d'un groupement carbonyle sur la protéine (Levine 2002). Ces groupements carbonyle peuvent être générés soit par oxydation directe des acides aminés, soit par conjugaison avec des produits de peroxydation lipidique ou encore par glycation. Ces modifications conformationnelles induisent des pertes de fonctions et stimulent l'activité protéolytique du protéasome (Levine 2002). L'oxydation des protéines est impliquée dans plusieurs conditions et pathologies telles que l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, le syndrome de détresse respiratoire, la dystrophie musculaire, l'ischémie-reperfusion cardiaque, le vieillissement (syndrome de Werner (vieillesse prématurée)). Au sein de la cellule, il existe toutefois des protéines chargées de restaurer les fonctions des protéines ayant subi une oxydation. Ces protéines appartiennent à la famille des Heat Shock Protein (HSP) et présentent un rôle cytoprotecteur (Welch 1992).

3.3.3. Oxydation de l'ADN

Les ERO possèdent une grande affinité de réaction avec certaines bases de l'ADN. Ainsi, l'oxydation conduit à la transformation de la guanine en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui va s'accumuler si les mécanismes de réparation impliquant des enzymes sont défectueux. Cette accumulation va à son tour induire des mutations pathogènes au sein du génome et plus particulièrement au niveau mitochondrial qui, rappelons-le, est dépourvu d'introns, augmentant ainsi statistiquement les mutations par rapport au génome nucléaire. Les mutations peuvent parfois toucher les gènes codant des protéines impliquées dans la chaîne de respiration (Cortopassi and Wang 1995) et provoquer l'exacerbation de la fuite

électronique mitochondriale et par conséquent la production d'ERO. Ainsi, il a été proposé une mise en place d'un « cercle vicieux » au sein de la mitochondrie, dans la mesure où les ERO nouvellement formés suite à une altération des protéines de la chaîne respiratoire accentuent l'oxydation de l'ADN, et sont susceptibles d'aggraver l'altération de la fonction des protéines mitochondriales.

4. Le stress oxydant dans la physiopathologie cardiovasculaire

Les perturbations cellulaires induites par le stress oxydant se répercutent au niveau tissulaire. Plusieurs études ont montré son implication dans la dysfonction endothéliale, l'hypertension artérielle, l'athérogénèse, le diabète ou encore l'obésité (Dobrian et al. 2001; Furukawa et al. 2004).

Depuis plusieurs années, il a été bien établi le rôle prépondérant des mécanismes antioxydants dans le maintien de la fonction cellulaire et ce, dès les stades précoces du développement. Il a été ainsi démontré chez la souris mutante pour le gène de la Mn-SOD, une létalité en période néonatale due à une dysfonction cardiaque (Y. Li et al. 1995). Ces résultats ont été appuyés par des études de mutagenèse dirigée, induisant une délétion spécifique de la Mn-SOD cardiaque, montrant une défaillance de la respiration mitochondriale associée à une insuffisance cardiaque congestive (Nojiri et al. 2006). La mitochondrie est capable de neutraliser les ERO telles que le peroxyde d'hydrogène à l'aide de la peroxyredoxine 3 (Prx3) (Kang et al. 1998). En outre, une surexpression de cette Prx3 chez la souris diminue le remodelage et l'insuffisance cardiaque après une ischémie (Matsushima et al. 2006).

Plusieurs études expérimentales ont démontré l'implication d'autres sources de production des ERO dans la physiopathologie cardiovasculaire. Les NADPH oxydases jouent ainsi un rôle dans le développement de l'athérosclérose, l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA), l'hypertrophie et la fibrose cardiaque (Barry-Lane et al. 2001; Johar et al. 2006; Thomas et al. 2006). De plus, l'augmentation de l'activité des NADPH oxydases a été observée dans différents modèles animaux d'hypertension artérielle (HTA) (Landmesser et al. 2003; Rajagopalan et al. 1996; Sicard et al. 2006).

La NOS endothéliale participe aussi à l'altération du système cardiovasculaire par l'intermédiaire de son co-facteur la BH₄, qui, lorsque sa biodisponibilité est diminuée, est responsable du découplage enzymatique conduisant à la production de l'anion superoxyde (Vasquez-Vivar et al. 1998). D'autres études viennent étayer le rôle du découplage de la

NOS dans la physiopathologie vasculaire notamment chez les sujets présentant un diabète et/ou des plaques athéromateuses (Guzik et al. 2002). Malgré un rôle néfaste du découplage de la NOS au niveau cardiovasculaire, il a été montré que cette enzyme joue un rôle cardioprotecteur, en atténuant l'hypertrophie ventriculaire gauche et en rétablissant les fonctions cardiaque après un infarctus (Janssens et al. 2004).

Quand le stress oxydant commence à se mettre en place, il fait intervenir une certaine synergie des mécanismes pro-oxydants, agissant ainsi de concert dans le développement des maladies cardiovasculaires. Les myeloperoxydases (MPO), principales génératrices de l'acide hypochloreux capable d'induire une dysfonction endothéliale, peuvent de manière concomitante stimuler le découplage de la NOS3 (Xu et al. 2006). Le taux plasmatique de MPO est corrélé positivement à la sévérité des lésions athéromateuses coronariennes (Duzguncinar et al. 2008) et la MPO circulante apparaît comme un bon indicateur pronostic des coronaropathies.

En résumé, les espèces réactives oxygénées sont produites de manière continue en condition physiologique par des mécanismes pro-oxydants. Elles exercent plusieurs rôles sur le système cardiovasculaire avant leur neutralisation par les systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Cependant, le stress oxydant ne suffit pas à lui seul à expliquer le développement des maladies cardiovasculaires.

III. Physiopathologie cardiovasculaire

1. La croissance cardiaque : du fœtus à l'adulte

Le cœur est le premier organe à être à la fois formé et fonctionnel au cours du développement. La formation du cœur implique des processus coordonnés de différenciation et de prolifération cellulaire.

1.1. Le cœur fœtal

Le développement cardiaque débute dès le stade embryonnaire et se poursuit jusqu'à l'âge adulte. Des études ont montré que les cardiomyocytes sont soumis à une très forte activité mitotique au cours de l'embryogenèse mais également au cours du stade fœtal (Manasek 1968; Oparil et al. 1984). Le processus prolifératif et de différenciation des myocytes cardiaques se produit durant le dernier semestre de la gestation (Garcia et al. 2002). Cette hyperplasie fœtale est accompagnée d'une légère augmentation de volume cellulaire indiquant la prédominance de la multiplication cellulaire par rapport à l'augmentation volumique cellulaire chez le mouton (Burrell et al. 2003).

1.2. Le cœur en période postnatale

Des études ont montré qu'au cours de la période néonatale, la plupart des cardiomyocytes perdent leur capacité proliférative, si bien que le cœur continue de croître, mais selon un processus qui est l'hypertrophie, correspondant à une augmentation de la taille cellulaire. Cette transition de fait de manière rapide, entre 3 et 4 jours après la naissance (F. Li et al. 1996). De plus, il a été démontré que chez les rongeurs, ce passage de l'état prolifératif à l'état hypertrophique est marqué par un dernier cycle de réplication de l'ADN sans division cellulaire, aboutissant à une population cardiomyocytaire binucléée (Soonpaa et al. 1996) avec des proportions variant en fonctions des espèces ; chez l'homme le pourcentage de cardiomyocytes binucléés se situe entre 25 et 57 % (Olivetti et al. 1996). Ainsi, lors du passage de la période fœtale à la période postnatale, il existe deux populations de cellules myocardiques. Cette binucléation marque la transition de la croissance par hyperplasie en hypertrophie (Clubb et al. 1986).

1.3. Le cœur adulte

A l'âge adulte, la croissance des cardiomyocytes se fait toujours par hypertrophie. Cette augmentation volumique se fait parallèlement à l'augmentation de la contrainte et de la charge de travail. Bien que la croissance par hypertrophie soit prédominante après la

naissance et ce jusqu'à la mort, des études ont montré que certains cardiomyocytes (0,005 %) notamment ventriculaires étaient capables de synthétiser leur ADN et présentaient donc une capacité de réplication à l'âge adulte (Soonpaa and Field 1997). Cette capacité de prolifération des cardiomyocytes adultes reste cependant très faible et limite ainsi le cœur à récupérer ses fonctions après un infarctus.

La croissance du cœur par hypertrophie est dite physiologique ou compensatrice afin de faire face à une charge de travail accrue, cependant, le prolongement de ce processus conduit à des effets néfastes tels que l'insuffisance cardiaque congestive, l'arythmie et la mort subite.

Sur le plan du métabolisme énergétique, il s'effectue également des changements au cours du développement de l'organe. Ainsi, au stade fœtal et ce jusqu'à la période postnatale, les principaux substrats soumis à l'oxydation sont le glucose et le lactate (Bartelds et al. 1998; Phelps et al. 1981). Progressivement après la naissance, le cœur effectue une transition de substrat, passant du glucose et lactate aux acides gras (Laughlin et al. 1993). L'augmentation de l'utilisation des acides gras est corrélée à leur libération par les tissus de stockage tels que le foie et les adipocytes mais également à la baisse de la concentration en malonylCoA (Abdel-aleem et al. 1998), exerçant un effet inhibiteur sur l'oxydation des acides gras.

2. Le métabolisme cardiaque

Le cœur est considéré comme un « omnivore métabolique » capable de tirer de l'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) des acides aminés, du glycogène, du pyruvate, des acides gras, du glucose et du lactate. Cependant, l'énergie utilisée provient principalement (environ 60 à 70 %) de l'oxydation des acides gras à longues chaînes suivie du glucose (30 %) puis dans une moindre mesure du lactate (10 %). Après un repas, le glucose constitue le substrat prédominant pour le métabolisme cardiaque (Opie 1969) ; en revanche, en période de jeûne, ce sont les acides gras qui représentent la principale source d'énergie (Ballard et al. 1960).

2.1. Catabolisme des acides gras

Dans le cœur, les capacités de stockage des acides gras sont limitées avec une oxydation complète en conditions physiologiques. Ainsi, l'utilisation des acides gras dépend plus de la composition plasmatique que de la régulation intracellulaire. L'entrée des acides gras à travers le sarcolemme se fait par l'intermédiaire des transporteurs FATP (Fatty Acid

Transporters Protein). La prise en charge des acides gras se fait ensuite par une protéine de transport spécifique du tissu cardiaque appelée H-FABP pour Heart-Fatty Acid Binding Protein (Binas et al. 1999).

Il s'en suit une conversion en acyl-coenzyme A (CoA) par l'acylCoA synthétase, enzyme située dans la membrane externe mitochondriale. Cet acyl-coenzyme A nouvellement formé va être pris en charge par un système de transport dépendant de la carnitine : la carnitine palmitoyltransférase-1 (CPT-1). Le rôle de cette enzyme est de catalyser la formation d'acyl-carnitine et de CoA à partir d'acyl-CoA et de L-carnitine libre. L'acyl-carnitine est transportée à travers la membrane interne de la mitochondrie grâce à une acyl-carnitine translocase en échange de carnitine libre. L'acyl-carnitine est ensuite réestérifiée en dérivés d'acyl-CoA dans la matrice mitochondriale grâce à la CPT-2 localisée au niveau de la membrane interne qui va ensuite subir la β -oxydation afin de générer les molécules d'ATP (Figure 11). Les acides gras ne subissant pas la β -oxydation sont stockés sous forme de triglycérides constituant ainsi une réserve énergétique.

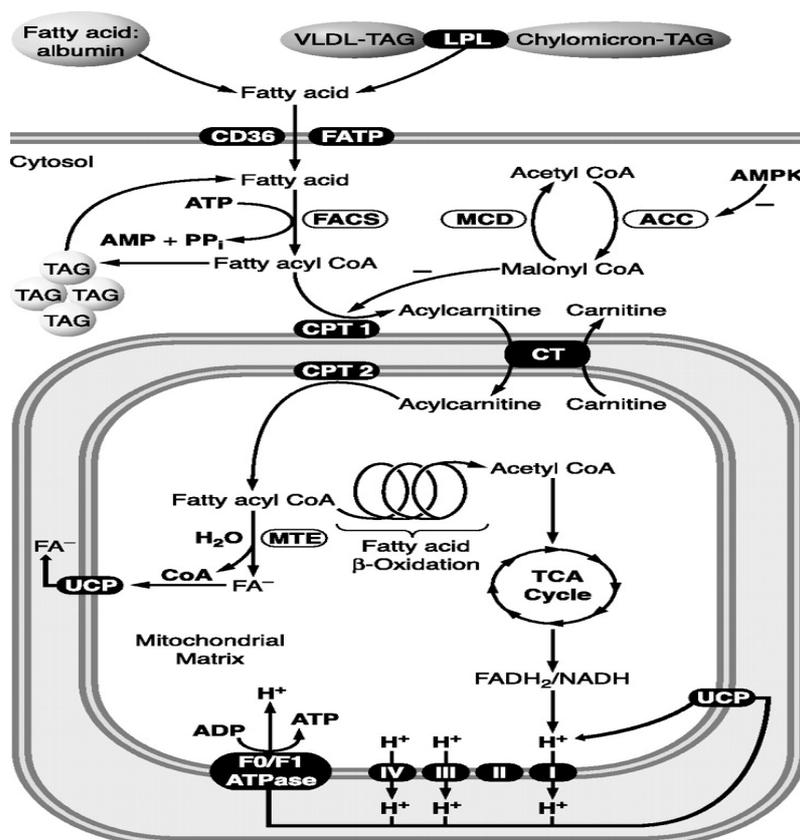


Figure 11 : Représentation schématique de la voie utilisant des acides gras libres comme substrat énergétique dans le myocarde. (Lopaschuk et al. 2010)

2.2. La glycolyse

L'existence d'un gradient de concentration du glucose entre le milieu extracellulaire et le cytosol cardiomyocytaire permet de ne faire intervenir aucune énergie nécessaire à son assimilation. Toutefois, l'entrée du glucose dans la cellule est régie par des transporteurs spécifiques appelés GLUT (Glucose Transporter). Dans les cardiomyocytes, il a été déterminé deux isoformes de GLUT : GLUT-1 et GLUT-4 avec une prépondérance pour l'isoforme GLUT-4 (James et al. 1989; Lopaschuk and Stanley 1997).

Le glucose cytosolique est ensuite converti en glucose-6-phosphate par l'enzyme hexokinase. Cette conversion du glucose lui permet d'être soit catabolisé par la voie de la glycolyse soit d'être stocké sous forme de glycogène pour constituer une réserve énergétique supplémentaire. Au cours de la glycolyse, le glucose-6-phosphate va subir une succession d'étapes enzymatiques afin d'être transformé en pyruvate par la pyruvate kinase. Ce pyruvate nouvellement formé va subir tout comme les acides gras, une oxydation par le cycle de Krebs au sein de la mitochondrie avec une étape préalable où il est transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (Figure 12).

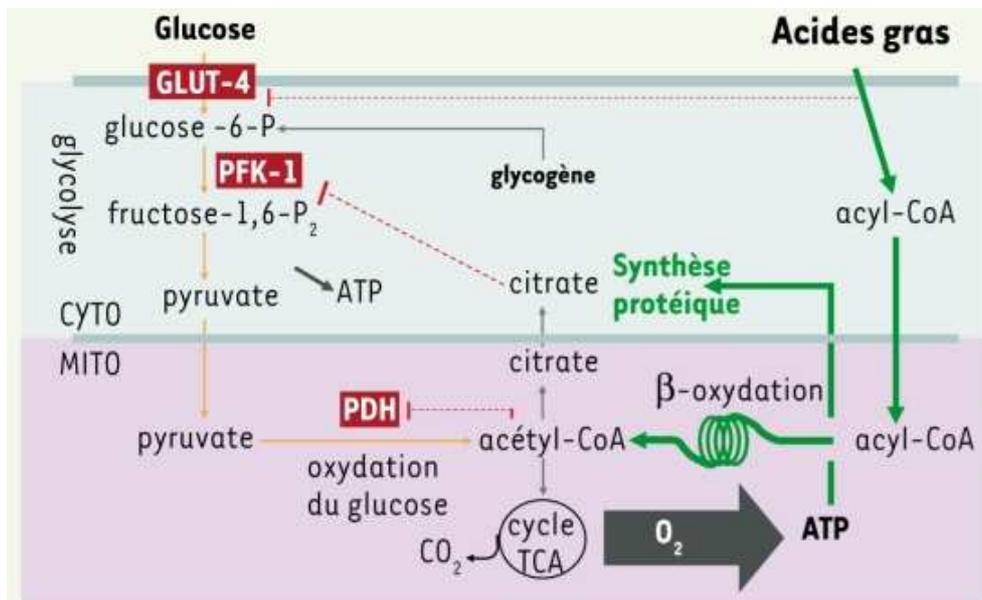


Figure 12 : Schématisation du métabolisme énergétique dans le muscle cardiaque.
(Foretz et al. 2006)

2.3. Utilisation du lactate

Longtemps considéré comme une substance toxique pour l'organisme, le lactate s'est révélé ultérieurement comme étant un substrat énergétique, notamment au niveau myocardique. Celui-ci est issu de la réduction du pyruvate par le NADH, H⁺, via la lactate déshydrogénase

(LDH). Le lactate produit provient principalement de la glycolyse effectuée au niveau des hématies, du cerveau et des muscles, avec une production journalière d'environ 1 500 mmol. Il a été démontré que le lactate constitue une réserve d'hydrate de carbone non négligeable, endossant de ce fait le rôle de navette énergétique inter-organe (Gladden 2004). En condition aérobie, le cœur privilégie la β -oxydation des acides gras qui est plus rentable sur le plan énergétique. Cependant, lorsqu'il y a inadéquation entre apport et consommation d'oxygène, le métabolisme énergétique est redirigé vers l'utilisation des hydrates de carbone, afin d'optimiser le rendement. Ainsi, le lactate apparaît comme étant un substrat de premier choix (Gladden 2004). Ces résultats sont corroborés par des études montrant une diminution des fonctions cardiaques lors d'une inhibition de la production de lactate (Barbee et al. 2000; Levy et al. 2007). En conditions hypoxiques, le cœur produit également du lactate générant le NAD^+ qui va retourner dans les étapes de la glycolyse ne nécessitant pas d'oxygène. Bien que cette voie d'utilisation du lactate soit peu rentable énergétiquement avec seulement 2 molécules d'ATP produites, elle reste cependant la seule voie de survie possible en attente d'une réoxygénation suffisante.

Nous avons vu précédemment qu'au stade fœtal, le glucose et le lactate priment sur l'utilisation des acides gras. Cette différence s'explique par le fait que les cœurs fœtaux sont dans un environnement relativement hypoxique. De plus, que ce soit en condition physiologique ou pathologique, le cœur est capable de rediriger son métabolisme vers une voie qui sera la plus rentable pour faire face à ses conditions. Ainsi, lors d'une ischémie, le substrat principalement utilisé est le glucose (Opie 1975), et les acides gras lors de la reperfusion ou encore au cours d'un exercice intense (Goodwin et al. 1998).

3. Ischémie-reperfusion myocardique

3.1. L'ischémie myocardique

L'ischémie cardiaque se définit par une diminution des apports de perfusion sanguine du myocarde par rapport aux besoins énergétiques. Les atteintes tissulaires peuvent être réversibles ou irréversibles en fonction de la durée et de l'intensité de l'ischémie. La réversibilité concerne 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.

L'ischémie induit une série d'anomalies (métaboliques et électrophysiologiques) qui vont conduire à une altération de la contractilité myocardique et par conséquent une modification de l'hémodynamique physiologique.

Il existe deux types d'ischémie myocardique : l'ischémie dite régionale et l'ischémie globale.

3.2. L'ischémie régionale

L'ischémie régionale fait suite à un rétrécissement de la lumière d'une artère coronaire, appelé sténose, provoquant une chute du débit coronaire. La sténose est due à une obstruction soit par un caillot sanguin, une plaque d'athérome ou une calcification. La sténose peut également s'observer lors de l'angor de Prinzmetal qui est défini par succession de spasmes coronaires altérant le débit sanguin coronaire. Ces spasmes peuvent être dus à une hyperactivité des cellules musculaires lisses ou plus généralement à une dysfonction endothéliale (Lanza et al. 2011).

3.3. L'ischémie globale

Lorsque que l'arrêt de la perfusion tissulaire concerne tout le cœur, on parle d'ischémie globale. Cette ischémie globale peut avoir comme étiologie cardiovasculaire un infarctus du myocarde induit par une ischémie régionale, un choc hypovolémique, un trouble de la conduction mais également un trouble du rythme. En effet, une tachycardie au même titre qu'une fibrillation ventriculaire altère la fonction hémodynamique principale du cœur et peut conduire à un arrêt cardiaque. Le cœur n'étant plus irrigué entre dans une phase ischémique. D'un point de vue clinique, pour des raisons de techniques chirurgicales (lors d'un pontage coronarien par exemple), la perfusion cardiaque peut être interrompue. Il faut savoir que les cellules myocardiques n'étant plus « irriguées » ont la capacité à se mettre en état de consommation énergétique minimale avant de l'arrêt de toute activité métabolique si la reperfusion n'est pas rétablie.

Que ce soit pour une ischémie régionale ou globale, la mort cellulaire en cas d'ischémie prolongée s'effectue selon un sens bien établi par Reimer et coll., en 1977. Ils ont permis, grâce à une ligature coronaire réalisée chez le chien, de mettre en évidence une propagation de la nécrose tissulaire se faisant des couches sous-endocardiques progressivement vers les couches sous-épicaudiques et du centre de la zone irriguée par l'artère occluse vers sa périphérie (Reimer et al. 1977) (Figure 13).

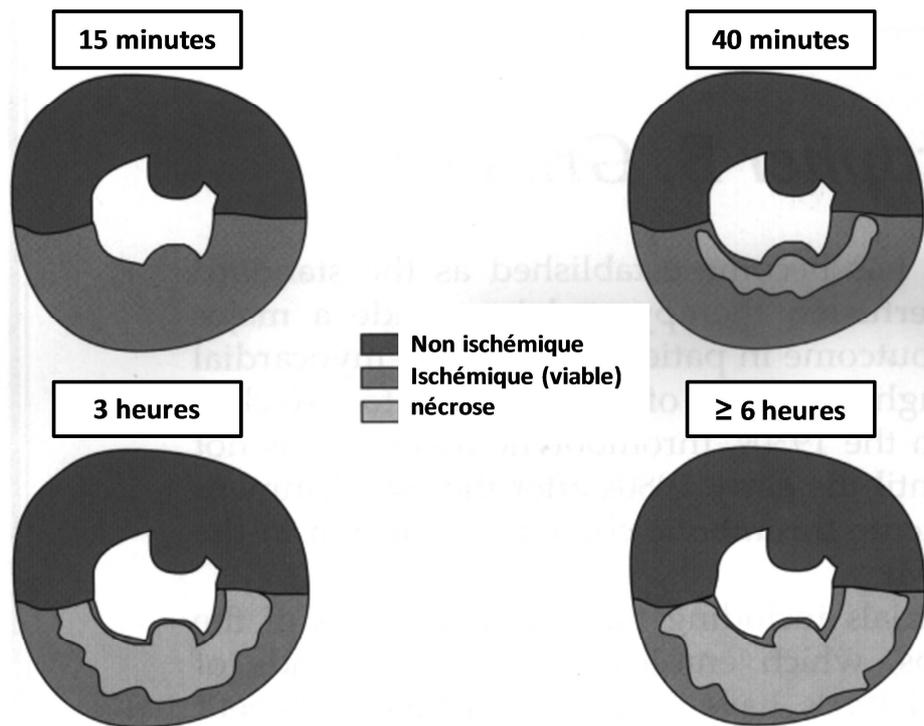


Figure 13 : Schéma représentant l'expansion de la nécrose en fonction du temps depuis l'occlusion de l'artère coupable.
(Jennings et al. 1983)

Lorsque la reperfusion d'une partie du myocarde est effectuée après l'occlusion coronaire et juste avant la mort cellulaire, il peut se produire un non regain de la fonction contractile initiale malgré une revascularisation complète. Ce phénomène réversible est appelé : sidération myocardique.

3.4. La sidération myocardique

Initialement décrite par Heyndrickx et coll., en 1975 (Heyndrickx et al. 1975), le concept de sidération myocardique (« stunning ») introduit par Braunwald et Kloner en 1982 (Braunwald and Kloner 1982) implique trois points :

- absence de nécrose
- reperfusion complète
- dysfonction contractile post-ischémique

Les mécanismes qui sous-tendent ce phénomène de sidération myocardique ne sont pas très bien définis. Cependant, il semblerait que la production d'espèces réactives de l'oxygène, l'altération de l'homéostasie calcique mais également l'altération structurelle des

protéines contractiles soient impliquées dans ce phénomène de « stunning » myocardique (Kloner and Jennings 2001).

3.5. La reperfusion myocardique

Afin de préserver au mieux le myocarde de la nécrose, il est impératif que la revascularisation tissulaire ait lieu, et ce, de manière précoce durant la phase où les altérations cellulaires sont encore réversibles (Jennings et al. 1960). Au cours de l'ischémie, les dommages cellulaires peuvent être nombreux. Parmi ces lésions, il peut se produire un œdème cellulaire qui va exercer une forte pression sur les capillaires de telle sorte qu'une fois la reperfusion effectuée, le diamètre des capillaires sera considérablement réduit. Il s'en suit un phénomène appelé « no-reflow ». Bien que la reperfusion soit nécessaire à la survie cardiomyocytaire, il est important de noter qu'elle n'est pas sans conséquences. Plusieurs études ont montré que la reperfusion peut accentuer voire initier les dommages cellulaires résultant d'une ischémie (Hearse et al. 1973; Jennings et al. 1960; Opie 1989; Rochette and Maupoil 1993; Siegmund et al. 1997), on parle alors de lésions de reperfusion.

3.6. Les lésions de reperfusion

Les lésions de reperfusion peuvent être diverses. Parmi ces lésions nous avons déjà évoqué la sidération myocardique décrite dans le paragraphe 2.1.3 et le phénomène de « no-reflow ». Associé à ces lésions, il peut survenir dès les premières minutes de reperfusion des arythmies souvent de hautes fréquences appelées tachyarythmies (Galagudza et al. 2004; Oxman et al. 1997).

Face à ces lésions, plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes impliqués lors de cette reperfusion. Les résultats ont montré une augmentation de la concentration calcique intracellulaire au cours de la reperfusion. Cette décharge de calcium cytosolique entraîne une hypercontracture (Ladilov et al. 1997; Siegmund et al. 1992) avec une augmentation de la production des ERO. La baisse du relargage du calcium par inhibition des pompes Ca^{2+} -ATPase induit un effet cardioprotecteur (Gao et al. 1996).

De par leur importance dans la production énergétique, les mitochondries occupent une place prépondérante dans la viabilité de la cellule. Il a été observé une altération de la perméabilité membranaire mitochondriale (Ruiz-Meana et al. 2009). En effet, des études aussi bien cliniques qu'expérimentales ont montré que durant la réoxygénation tissulaire, il se produit une explosion de la production des ERO (Bolli et al. 1989; Roberts et al. 1990) notamment dès les premières minutes de la reperfusion avec une prépondérance pour le peroxy-nitrite, reconnu comme étant une molécule impliquée dans les lésions de reperfusion (Pacher et al. 2007). Cette augmentation radicalaire peut initier la peroxydation des acides

gras non saturés de la membrane mitochondriale conduisant à une ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). L'ouverture de ce pore est depuis longtemps connu comme étant induit par la combinaison d'une surcharge calcique et du stress oxydant (Crompton and Costi 1988). D'autres travaux ont par la suite démontré que ce mPTP est à l'origine de la mort cellulaire durant la séquence d'ischémie-reperfusion (Griffiths and Halestrap 1995). Le maintien de l'ouverture provoque un gonflement qui a pour conséquence une perte de tous les gradients ioniques indispensables à la phosphorylation oxydative responsable de la synthèse d'ATP et donc de la survie cellulaire. L'inhibition du mPTP permet de lutter contre les lésions induites par la reperfusion (Hausenloy et al. 2003). Associées à ces altérations aussi bien mitochondriales que cytosoliques, il a été démontré une importance du processus inflammatoire dans les dommages cellulaires liées à la reperfusion (Park and Lucchesi 1999), caractérisé par une activation du complément, des polynucléaires neutrophiles et leur adhésion.

4. La cicatrisation et le remodelage post-infarctus

4.1. La cicatrisation

Suite à une séquence d'ischémie-reperfusion, le myocarde entre dans un processus de réparation. Cette réparation fait intervenir plusieurs cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion et des protéines de la matrice extracellulaire au niveau de la zone infarctée. Cette phase inflammatoire va permettre un recrutement cellulaire, principalement les monocytes et neutrophiles. Les débris cellulaires issus des cardiomyocytes nécrosés vont être pris en charge par les neutrophiles ou polymorphonucleocytes (PMN) jouant ainsi un rôle d'épuration myocardique (Jones et al. 2000).

Le processus de cicatrisation passe par une phase proliférative donnant lieu à un tissu de granulation constitué principalement de macrophages et de fibroblastes qui sécrètent les constituants de la MEC (matrice extracellulaire) et en particulier du collagène.

Ces fibroblastes endogènes vont proliférer et se différencier en myofibroblastes, qui sont des cellules intermédiaires entre les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. En dehors de toutes atteintes cardiaques, ces cellules ne sont pas présentes dans le myocarde hormis les valves (Sun and Weber 2000). Il a été démontré que l'hypoxie générée par l'arrêt du flux sanguin favorise cette différenciation (Clancy et al. 2007). Les fibroblastes sont responsables de la synthèse de collagène et de protéines de la MEC qui vont aboutir à la formation d'une fibrose cicatricielle. Sur le plan moléculaire, cette stimulation de synthèse protéique est induite en partie par le système rénine-angiotensine et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) (Bujak and Frangogiannis 2007; Lijnen et al. 2000). (Figure 14).

De plus, des études ont montré que les macrophages infiltrés sécrètent toute une variété de facteurs chimiotactiques et de croissance tels que le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le TGF- β et l'interleukine 1 (IL-1), conduisant à une transformation des fibroblastes en myofibroblastes (Detillieux et al. 2003).

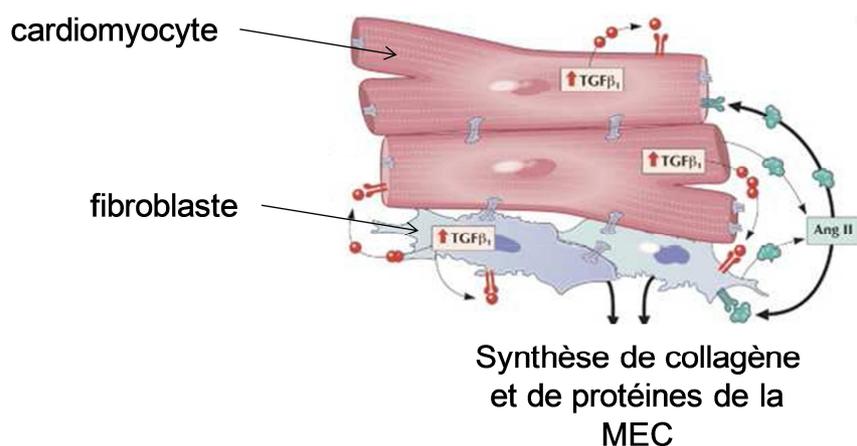


Figure 14 : Schéma des régulations autocrines et paracrines induisant la synthèse de collagène et de la matrice extracellulaire (MEC) responsable de la fibrose. Modifié d'après Burstein *et coll.* (Burstein et al. 2008).

La prolifération myofibroblastique nécessaire à la cicatrisation tissulaire, demande un apport conséquent en oxygène; si bien qu'au niveau de la zone lésée, on constate une augmentation de la densité capillaire induit par un bourgeonnement des vaisseaux situés en périphérie de cette zone. Il a été montré que suite à une ischémie, il se produit une activation du facteur de transcription HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α), qui stimule la production du facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) (Hashimoto et al. 1994). Les fibroblastes cardiaques augmentent également leur sécrétion de VEGF lors de l'hypoxie (Kelly et al. 2003) et en conditions inflammatoires (Chintalgattu et al. 2003). Cette angiogenèse post-ischémique peut être davantage stimulée par les espèces réactives de l'oxygène (W. Zhao et al. 2009), qui rappelons le sont produites massivement durant la phase de reperfusion.

Ce processus de cicatrisation est accompagné d'une réinnervation des fibres sympathiques par germination des fibres préexistantes (Zhou et al. 2004) faisant intervenir plusieurs facteurs neurotropiques tels que le facteur de croissance neuronal (NGF) et le facteur de croissance de l'insuline (IGF).

Après la phase de cicatrisation, le tissu granulaire va laisser place à la cicatrice composée de fibres de collagène. Cependant, une cicatrisation inappropriée peut conduire à une

dilatation ventriculaire et à un remodelage cardiaque, responsable à long terme d'une insuffisance cardiaque (Thakker et al. 2006).

4.2. Le remodelage cardiaque

Après un infarctus, le myocarde subit de grandes modifications, aussi bien sur le plan architectural, modifiant la géométrie ventriculaire, que sur le plan fonctionnel. Ce remodelage repose sur un équilibre entre des effets bénéfiques et des effets délétères. Les effets bénéfiques vont permettre au myocarde de récupérer ses fonctions avant l'atteinte ischémique. En revanche, les effets délétères vont quant à eux conduire le cœur vers une insuffisance cardiaque. De manière générale, après une séquence ischémique, il y a une augmentation des volumes ventriculaires. Celle-ci se fait en deux phases ; une phase d'expansion de la zone infarctée et une phase de remodelage myocardique.

4.3. Expansion de la zone nécrosée

Nous avons vu précédemment qu'au sein de la zone infarctée, il s'effectue une mise en place d'un processus inflammatoire avec un recrutement leucocytaire menant à une cicatrisation. Au cours de cette dernière, il se produit un amincissement pariétal et une expansion de la zone nécrosée, induits par l'augmentation des contraintes murales. Cette expansion et cet amincissement reposent sur un mécanisme de glissement des cardiomyocytes nécrosés les uns sur les autres via une profonde modification structurale de la matrice extracellulaire, mais également sur une réduction de l'espace intercellulaire, une rupture et une élongation des fibres musculaires nécrotiques. Ces phénomènes surviennent dans un temps court, qui s'étend de quelques jours à quelques semaines après l'épisode ischémique (Hutchins and Bulkley 1978). Par ailleurs, il est important de noter que ces mécanismes impliqués dans le remodelage seront d'autant plus intenses et prolongés que la taille de l'infarctus sera grande. Avec une fréquence plus élevée lors d'un infarctus transmural ou encore au niveau de la région apicale où la paroi myocardique est mince (Pirolo et al. 1986).

A plus ou moins long terme, allant de quelques mois à quelques années, il se produit également des modifications de la zone non infarctée initiées par une surcharge volumétrique.

4.4. Dilatation et hypertrophie de la zone non nécrosée

Au cours de ce remodelage myocardique, plusieurs mécanismes interviennent. Ces processus apparaissant après plusieurs jours, voire plusieurs mois, correspondent à des mécanismes adaptatifs. Dans un premier temps, la surcharge en volume (augmentation de la précharge) induit un étirement des cardiomyocytes et une augmentation des performances

cardiaques selon la loi de Franck Starling. De la même manière, la dilatation ventriculaire permet de maintenir un volume d'éjection systolique, altéré par l'ischémie. Cette dilatation ventriculaire due essentiellement à une contrainte pariétale entraîne fréquemment une hypertrophie dite compensatrice afin de maintenir un débit cardiaque suffisant (Heineke and Molkentin 2006) selon la loi de Laplace. Cependant, ce mécanisme adaptatif reste insuffisant lors des infarctus transmuraux.

Afin de continuer à maintenir un volume d'éjection satisfaisant, il se produit également une activation du système sympathique avec augmentation des fibres au niveau de la zone infarctée mais également au niveau de la zone saine située en périphérie de la zone nécrosée (Oh et al. 2006). À plus long terme, cette activation sympathique demeure inefficace par diminution des récepteurs bêta. Dans certains cas, il peut se produire une innervation trop importante qui peut conduire à une augmentation de l'incidence des arythmies chez les sujets ayant subi un infarctus (Miyachi et al. 2003).

Parallèlement, il existe une prolifération des cellules non musculaires et une réorganisation de la matrice extracellulaire caractérisée par une fibrose interstitielle qui aboutit à une diminution de la compliance myocardique.

4.5. La fibrose cardiaque

Nous avons vu précédemment que les fibroblastes se différencient en myofibroblastes afin d'assurer le processus de cicatrisation. Cette différenciation est activée rappelons-le, par de nombreux stimuli tels que les facteurs de croissance, l'hypoxie mais également par un étirement mécanique (Hinz et al. 2001).

Une prolifération fibroblastique accrue est associée à une production massive des constituants de la MEC conduisant à une fibrose cardiaque.

Il existe deux types de fibrose ; une fibrose dite réactive et une fibrose réparatrice. La fibrose réactive correspond à une accumulation de collagène dans l'espace interstitiel et l'adventice des artères coronaires intramyocardiques, et ce en l'absence de nécrose (F. Yang et al. 2002). Généralement, la fibrose réactive se produit au cours de maladies inflammatoires telles que les myocardites ou la maladie de Chagas.

La fibrose réparatrice apparaît quant à elle au cours d'une ischémie ou d'une sénescence au niveau des cicatrices fibreuses. Elle va se propager dans tout le myocarde, remplaçant progressivement les cardiomyocytes périphériques entrant en apoptose (Sharov et al. 1997). L'accumulation excessive de collagène tissulaire responsable de la fibrose fait intervenir principalement le collagène de type I et III, qui sont majoritairement impliqués dans les pathologies cliniques. Il a été démontré chez le rat, que les contraintes mécaniques et

l'hypoxie induisent une augmentation de l'expression du collagène de type I et III par les fibroblastes cardiaques (Atance et al. 2004) (Tamamori et al. 1997).

Il faut noter que le renouvellement de la MEC est régulé par la balance entre production et dégradation du collagène ainsi que des autres composants de la matrice. La dégradation de la MEC est assurée par les metalloproteinases (MMPs). Ces MMPs produites par les fibroblastes assurent en effet, via la dégradation du collagène, leur migration et leur prolifération dans les zones atteintes.

Cette balance est finement régulée par de nombreuses substances. Ainsi, le TNF α et l'IL-1 β sont des substances anti-fibrotiques, qui augmentent l'expression des MMP-2 et 9 et diminuent la synthèse de collagène (Turner et al. 2007) (Siwik et al. 2000). A l'inverse, des substances telles que le TGF- β et l'angiotensine II sont pro-fibrotiques dans la mesure où ils augmentent la synthèse de collagène et diminuent celle des MMPs (Pan et al. 2008; Stacy et al. 2007).

De plus, le « burst » oxydant survenant lors de la reperfusion a également été démontré comme étant un facteur pro-hypertrophique et pro-fibrotique. Parmi toutes les sources génératrices d'ERO, la NADPH semble être l'enzyme la plus largement impliquée dans ces processus de réparation et de compensation (Akki et al. 2009; Nakagami et al. 2003). Ainsi, cette surproduction des composants de la MEC va altérer à la fois la structure et l'architecture du cœur et induire des effets néfastes sur la fonction cardiaque.

5. Structure et fonction cardiaque au cours du surpoids

Nous avons vu précédemment que le surpoids est un facteur de risque très largement impliqué dans le développement des maladies cardiovasculaires via la composante sécrétrice des adipocytes mais également via la part hémodynamique. En effet, l'augmentation de masse grasse, par l'intermédiaire d'une augmentation volumique, une augmentation à la fois de la précharge, de la postcharge et de la résistance périphérique (Palmieri et al. 2001). Aujourd'hui, il est clairement établi que les facteurs métaboliques couplés aux facteurs hémodynamiques tels que l'augmentation de la pression artérielle induisent un remodelage cardiaque avec un épaississement de la paroi ventriculaire (Lopez-Candales 2001); cependant, cet effet sur la structure est amplifié voire dépendant de l'excès de masse grasse (Norton et al. 2009).

Gates *et coll.* ont montré que la prise de masse grasse principalement abdominale, participe au remodelage ventriculaire associé à une diminution de la fonction diastolique (Gates et al. 2003) passant principalement par une dilatation ventriculaire. Concernant, la fonction systolique, elle ne semble pas être affectée chez les sujets présentant un IMC supérieur à

25. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il se produit une compensation par un changement structurel (Kathrotia et al. 2010). Cependant, certaines études ont montré que la fonction systolique est altérée au cours d'une obésité prononcée (Ferraro et al. 1996). Les mécanismes exacts de dysfonction restent assez flous, cependant, il semblerait que l'adaptation cardiaque suite à une surcharge volumique chez les sujets en surpoids et obèses passe par une hypertrophie de type excentrique. L'augmentation de la masse ventriculaire contribue à accentuer la résistance au remplissage conduisant ainsi à une diminution de la fonction diastolique.

Il a été démontré que le surpoids est un facteur prépondérant dans la dysfonction cardiaque et ce indépendamment des autres facteurs de risque tels que l'hypertension artérielle ou le diabète (Russo et al. 2011).

La dysfonction diastolique ventriculaire gauche au cours de la surcharge pondérale est considérée comme étant un paramètre reflétant une altération des propriétés de remplissage ventriculaire, faisant ainsi un bon indicateur d'une possible évolution vers une insuffisance cardiaque.

IV. HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE LA THESE

Nous avons vu que le surpoids est associé à une augmentation du risque cardiovasculaire représenté par une dyslipidémie, une résistance à l'insuline ainsi qu'une hypertension artérielle. Ces facteurs de risque sont regroupés sous le terme de syndrome métabolique, correspondant à un état pathologique augmentant de manière significative la survenue d'évènements pathologiques cardiovasculaires et tumoraux. La majoration du stress oxydant, qui peut être parfois associé à un surpoids, est un des facteurs impliqué dans l'initiation des maladies cardiovasculaires. Ceci a été démontré aussi bien dans des modèles expérimentaux que chez des patients en surpoids ou obèses.

Nous avons dans l'étude bibliographique rappelé les relations susceptibles d'exister entre le surpoids, les paramètres biochimiques, le niveau de stress oxydant dans l'étiologie de certains états physiopathologiques. Des hypothèses ont été avancées mettant l'accent sur l'influence de facteurs environnementaux au stade précoce du développement chez l'homme. Parmi ces facteurs, le niveau et la qualité de la nutrition postnatale influenceraient l'état physiologique ultérieur à court terme et à plus long terme.

C'est dans ce contexte que le travail de Thèse a été réalisé. Notre principal objectif a été de caractériser les conséquences métaboliques, cardiovasculaires et oxydatives d'une suralimentation postnatale chez l'animal.

Le but initial de la première partie de notre étude expérimentale fût de montrer, chez le rat Wistar, que la perturbation nutritionnelle juste après la naissance (SAPN) était capable d'induire des altérations pondérales et métaboliques pérennes, qui présentent des conséquences à long terme chez l'adulte. Le deuxième objectif a été d'étudier l'impact de ces modifications précoces de l'environnement nutritionnel sur le niveau du stress oxydant. Enfin, nous avons voulu en mesurer l'effet sur les paramètres cardiaques en faisant appel à une technique *ex vivo* du cœur isolé perfusé travaillant. L'ensemble de ce travail est présenté dans l'article I.

Dans la seconde partie de notre étude, nous avons utilisé la souris C57BL/6 comme modèle, une espèce connue pour être plus sensibles aux régimes athérogènes. L'objectif de cette deuxième partie a été de confirmer les résultats obtenus dans la première partie et d'accentuer l'observation des altérations, principalement au niveau cardiaque, à l'aide de l'imagerie *in vivo* notamment avec l'utilisation de l'échocardiographie. Ce travail actuellement soumis pour publication, est présenté dans l'article II. Par ailleurs, il faut souligner que l'utilisation du modèle animal murin, est une ouverture vers des modèles génétiquement modifiés, ce qui nous permettra probablement dans le futur d'étayer nos hypothèses sur l'origine moléculaire des mécanismes impliqués dans le développement de maladies de l'âge

mature induits précocement par des changements nutritionnels survenant après la naissance.

PARTIE II. ETUDES EXPERIMENTALES

Introduction

Comme nous l'avons déjà évoqué dans la partie introductive, les pathologies cardiovasculaires constituent aujourd'hui non seulement l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité en Europe et sur le continent Nord-Américain, mais elles font surtout l'objet d'une progression de type exponentiel dans certains pays en voie de développement ; ainsi, le nombre de décès qui en résultent devrait atteindre plus de 24 millions en 2030, ce qui représente une des principales préoccupations actuelles en termes de Santé Publique à l'échelle mondiale. Les modes de vie dits « occidentaux » et leur adaptation dans d'autres régions du globe contribuent à une épidémie mondiale de diabète de type 2 et du syndrome métabolique, tous deux constituant des facteurs de risque cardiovasculaire majeurs et regroupant des éléments tels que l'insulino-résistance, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie athérogène et un surpoids ou une obésité centrale.

D'une manière comparable à celle des pathologies cardiovasculaires, la prise en charge du surpoids et de l'obésité constitue elle aussi l'un des grands défis de ce Siècle. L'estimation de la prévalence combinée de l'obésité et du surpoids chez les adultes âgés de 20 à 70 ans aux Etats-Unis en 2007-2008 était de 68% (Flegal et al. 2010). De manière inquiétante, la prévalence de l'obésité chez l'enfant a pratiquement triplé au cours des 30 dernières années (Inge et al. 2004). Aujourd'hui, les études épidémiologiques sur la prise de poids fournissent des données alarmantes justifiant ainsi l'intérêt porté par les recherches aussi bien cliniques que fondamentales. Il s'agit en effet d'un problème capital de Santé Publique en raison du risque majeur de développement de pathologies métaboliques chroniques qui font le lit ultérieur des maladies cardiovasculaires (Malnick and Knobler 2006).

En dehors d'aspects génétiques, de mauvaises habitudes alimentaires et un style de vie sédentaire sont habituellement reconnus comme les facteurs contribuant de manière majoritaire à l'épidémie d'obésité actuelle. Il est effectivement indiscutable qu'une forme de « transition nutritionnelle », classiquement décrite comme « occidentalisation » des comportements alimentaires et énergétiques est propice à la surcharge pondérale, mais aussi aux maladies cardio-métaboliques et aux cancers. Toutefois, l'ampleur du phénomène indique que d'autres éléments sont susceptibles de jouer un rôle, peut-être aujourd'hui sous-estimé, dans la survenue de cette épidémie.

Historiquement, ce sont les travaux épidémiologiques conduits par Barker dans les années 1990 qui ont pour la première fois pointé le doigt sur l'éventualité que des événements précoces de la vie puissent jouer un rôle majeur dans le développement du surpoids et de pathologies chroniques à l'âge adulte (Barker 1995). En effet, dans ses travaux, il montra que les nouveaux nés de faible poids de naissance, en raison d'un statut de malnutrition lors

de la grossesse, étaient plus à même de développer un phénotype adulte de surpoids et de sensibilité à la survenue de pathologies cardio-métaboliques. Ces travaux ont été par la suite corroborés par de nombreuses autres études, conduites chez l'homme ou chez l'animal d'expérimentation, et qui ont établi de manière certaine la notion de « programmation foétale ». En effet, il est aujourd'hui complètement acquis que l'environnement, notamment nutritionnel ou hormonal, pendant la période embryonnaire et foétale joue un rôle essentiel de modulation, pouvant orienter l'expression du génome dans un sens ou l'autre. Toutefois, lors de la période postnatale immédiate, cette plasticité du génome subsiste toujours, bien que peut-être à moindre niveau (Barker 1995). Effectivement, chez la plupart des mammifères, le développement d'un certain nombre d'organes n'est pas parachevé à la naissance, et se poursuit pendant la période post-natale immédiate de l'allaitement maternel. C'est le cas chez le rat par exemple au niveau des îlots pancréatiques et des circuits neuronaux hypothalamiques (Grove and Smith 2003; Kaung 1994). Ainsi, des stimuli environnementaux, physiques, psychiques ou nutritionnels, peuvent infléchir à leur tour l'expression génomique de la descendance, lui permettant en théorie de mieux s'adapter à son environnement, en tout cas à court terme. Or, à plus longue échéance, ces changements peuvent se révéler inadaptés, et même délétères, car ils prédisposent l'organisme adulte à des désordres métaboliques.

Dans ce cadre, les travaux initialement publiés par Plagemann en 1999 ont pu montrer chez le rat, que la réduction du nombre de petits par portée après la naissance, permettait d'accroître nettement leurs apports nutritionnels en augmentant l'accessibilité à un lait maternel dont la composition se trouvait par ailleurs enrichie. Cette situation de « suralimentation postnatale » était susceptible d'induire des changements immédiats et définitifs du fonctionnement des circuits hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la satiété et de la dépense énergétique (Davidowa and Plagemann 2004), et par voie de conséquence du poids corporel. Ces modifications du système de neurotransmission hypothalamique sont caractérisées par une augmentation du nombre de neurones neuropeptidergiques Y dans les noyaux ventro-médians et arqués, associée à une augmentation des signalisations orexigéniques et une diminution des signaux anorexigéniques. Au niveau biochimique, les rats ayant subi une suralimentation postnatale présentent une hyperglycémie à jeun, une hyperinsulinémie et une hyperleptinémie concomitantes à des résistances centrales et périphériques à ces hormones. D'autres travaux ont pu montrer par la suite des modifications endocriniennes (augmentation des voies de synthèse des glucocorticoïdes (Boullu-Ciocca et al. 2005)) et parfois de discrètes augmentations du niveau de pression artérielle.

Ainsi, le modèle de suralimentation postnatale conduit à des altérations biochimiques et physiopathologiques qui se rapprochent de la définition donnée chez l'homme du syndrome métabolique, et il pourrait constituer un modèle intéressant d'étude des conséquences à long terme d'un surpoids induit dans l'enfance.

Bien entendu, il existe de nombreux modèles expérimentaux d'étude de l'obésité chez le rat et la souris qui ont permis des avancées notables sur la compréhension des mécanismes responsables des conséquences cardiovasculaires de cette situation. Ainsi, certains modèles génétiques correspondent à des conditions où l'obésité, de type morbide, est induite par une déficience de la signalisation de la leptine, par absence totale de cette adipokine (rat Zucker fa/fa, souris ob/ob) ou de son récepteur (souris db/db). Malheureusement, les causes strictement génétiques d'obésité chez l'homme ne représentent qu'une part infime des cas recensés, et sont accompagnées d'anomalies particulièrement graves du métabolisme, aux conséquences parfois dramatiques très précocement. Une autre méthode d'induire un surpoids majeur chez l'animal d'expérimentation est d'utilisation de régimes enrichis en lipides ou en glucides, « high-fat » ou « cafétéria », qui conduisent rapidement à une prise de poids majeure, dans laquelle la masse corporelle des animaux peut doubler par rapport aux animaux témoins. Ainsi, les conditions obtenues là-aussi correspondent à une obésité très exacerbée, probablement peu représentative des conditions susceptibles de conduire chez l'homme à un surpoids. Le modèle de suralimentation postnatale chez le rat ou la souris, pour lequel le poids corporel adulte n'excède pas 30% de plus que celui d'animaux ayant reçu une alimentation postnatale normale, pourrait alors constituer un outil de choix pour l'étude des conséquences du surpoids modéré chez l'adulte. Toutefois, jusqu'à lors, peu de travaux ont exploré en profondeur les conséquences cardiovasculaires de ce surpoids modéré.

Dans notre introduction, nous avons largement développé la définition et les implications physiopathologiques du stress nitro-oxydant, dont la responsabilité est aujourd'hui parfaitement établie dans l'initiation et le développement des processus associés à l'athérosclérose, au diabète de type 2, à l'obésité (Suzuki et al. 2003; Urakawa et al. 2003), ou à la dysfonction cardiaque (Pichardo et al. 1999; Viaro et al. 2000). En outre, au niveau cardiaque, le stress nitro-oxydant est susceptible d'aggraver les lésions d'ischémie et la flambée oxydative de la perfusion initie des dysfonctions membranaires et intracellulaires qui peuvent accélérer les dommages ischémiques et que l'on regroupe sous le terme de « lésions de reperfusion ».

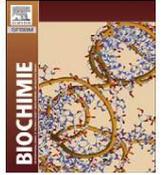
Ainsi, le but de notre travail de Doctorat a été d'étudier les conséquences métaboliques, oxydatives et cardiovasculaires de la suralimentation post-natale chez le rat et la souris.

Dans un premier travail, publié cette année dans *Biochimie* (IF 3,96), notre étude a été conduite chez le rat, afin de mettre en place ce modèle au sein du Laboratoire et d'en explorer les conséquences oxydatives et cardiovasculaires, alors que des données antérieures de la littérature nous permettaient des bases de comparaison objectives au niveau de paramètres biochimiques ou métaboliques.

Dans une deuxième partie de notre Thèse, nous avons souhaité étendre notre étude à la souris, en raison du faible nombre de travaux publiés sur les incidences de la suralimentation postnatale dans cette espèce (deux seulement), au regard du très grand nombre d'études portant sur des modèles murins, et particulièrement ceux dont le patrimoine génétique a été modifié. Ainsi, l'objectif de cette deuxième étude était 1) de confirmer chez la souris C57Bl/6 les résultats de la précédente conduite chez le rat, mais également 2) d'apporter de nouvelles données quant aux conséquences de la suralimentation postnatale sur le déséquilibre de la balance redox et sur la physio-pathologie cardiovasculaires, et enfin 3) de tenter d'expliquer les mécanismes sous-jacents à l'origine de ces modifications.

Ce travail sera prochainement soumis pour publication.

ARTICLE I



Research paper

Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood

Ahmed Habbout, Stephanie Delemasure, Françoise Goirand, Jean-Claude Guillard, Franck Chabod, Mourad Sediki, Luc Rochette, Catherine Vergely*

Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales (EA2979), Facultés de Médecine et Pharmacie, IFR SANTE-STIC, Université de Bourgogne, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2011
Accepted 22 September 2011
Available online 1 October 2011

Keywords:

Postnatal overfeeding
Oxidative stress
Heart
Ischemia
Rats

ABSTRACT

In contrast to the masses of data on obesity, few data are available concerning the cardiometabolic and oxidative consequences of moderate overweight. The model of postnatal overfeeding (OF) induces an increase in body weight at weaning that remains during adult life.

Litters of Wistar rats were either maintained at 12 pups (normal-fed group, NF), or reduced to 3 pups at birth in order to induce OF. At 6 months of age, metabolic parameters, circulating oxidative stress and aortic and coronary vasoreactivity were assessed. Cardiac susceptibility to ischemia-reperfusion injury was also evaluated *ex vivo* as were markers of cardiac remodeling. OF led to an increase in body weight at weaning (+50%); the increase in body weight persisted throughout adult life, but was less marked (+10%). Significant increases in plasma levels of fasting glucose, insulin and leptin were found in OF rats. An increase in both plasma hydroperoxides and cardiac superoxide dismutase activity and a decrease in plasma ascorbate were found in OF rats. Vasoreactivity was not modified, but *ex vivo*, after 30 min of ischemia, isolated hearts from OF rats showed lower recovery of coronary flow along with a greater release of LDH. Studies on heart tissues showed an increase in collagen content and increased expression and activity of MMP-2.

Our findings show that moderate overweight in adult rats, induced by postnatal overfeeding, leads to both metabolic and oxidative disturbances as well as a higher susceptibility to cardiac injury after ischemia *ex vivo*, which may be explained, at least in part, by ventricular remodeling.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Metabolic syndrome, a cluster of abnormalities including the build-up of abdominal fat, glucose imbalance, dyslipidaemia and increased blood pressure, is a major risk factor for the development of cardiovascular diseases. We have already shown that the prevalence of metabolic syndrome in an unselected population of patients with myocardial infarction was high, and that a high body mass index (BMI) and waist circumference were associated with

a greater risk of heart failure and death at one year [1,2]. Clinical and experimental evidence shows that the nutritional environment during the peri-natal period plays an important role in regulating both metabolic and hormonal tendencies in adulthood, and that nutrition in early life has an impact on the subsequent risk of overweight and hypertension [3]. In the past few years, certain authors showed that inducing early post-natal over-nutrition in rats, just by reducing litter sizes, led to considerable increases in body weight at weaning (nearly 30%); the increase in body weight persisted into adulthood, but was less marked (10–15% increase) [4–6]. Certain authors reported increases in fasting glucose, plasma insulin, triglycerides and leptin levels at weaning and later [7–9], while others found a discrete increase in blood pressure [4,10]. Thus, a cluster of symptoms characteristic of metabolic syndrome occurred in neonatally overfed rats. However, few in-depth studies have investigated the cardiovascular consequences of this moderate overweight.

While much work has been done on the cardiovascular consequences of high-fat diets or on genetically obese experimental

Abbreviations: Ach, acetylcholine; ANOVA, analysis of variance; AU, arbitrary units; BMI, body mass index; BK, bradykinin; +dP/dt, left ventricular maximal pressure development; -dP/dt, left ventricular minimal pressure development; HR, heart rate; IU, international units; L, Langendorff mode; LDH, lactate dehydrogenase; LVDP, left ventricular developed pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVESP, left ventricular end-systolic pressure; MMP-2, matrix metallo-proteinase-2; NF, normal-fed; OF, overfeeding; SOD, superoxide dismutase; ROOH, hydroperoxides; SNP, sodium nitroprusside; W, working mode.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 80 39 34 60; fax: +33 3 80 39 32 93.
E-mail address: cvergely@u-bourgogne.fr (C. Vergely).

animals, little research has been reported on the cardiovascular consequences of moderate overweight, and postnatal overfeeding might provide a good experimental model to study the classical risk factors of cardiovascular disease associated with early-induced permanent overweight. In addition, several experimental studies have demonstrated that in overweight or obese individuals, an increase in energy metabolism increases the production of reactive oxygen species [11]. As a consequence, this general increase in oxidative stress is able to initiate or reinforce various metabolic or functional disorders, which in turn accentuate pathologies such as hypertension, atherosclerosis or heart failure [12].

Therefore, the aim of our work was to evaluate the metabolic, oxidative and cardiovascular consequences of moderate overweight induced by postnatal over-nutrition in rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diets

Adult female Wistar rats (Charles River, L'Arbresle, France) were caged with male rats at a proportion of 2:1, then housed in individual cages and given water and a standard pellet diet *ad libitum* (A03, SAFE Diets Augy, France) during pregnancy and lactation. At birth, the litters of fewer than 8 or more than 12 pups were excluded from the experiments. Within 48 h of birth, male pups from different litters were grouped, and randomly assigned to either 12 pups/dam (normal-fed, NF group) or only 3 pups/dam in order to induce postnatal overfeeding (over-fed, OF group). After weaning (day 24), rats of both groups had free access to a standard diet (A03, SAFE Diets Augy, France) and water. Throughout life, body weight and food intake were measured weekly then monthly. The local Ethics Committee approved the experimental protocol (see paragraph 5), and the investigators complied with authorization 3408 of the French government. The investigation complies with Directive 2010/63/EU of the European Parliament.

2.2. Plasma and tissue sampling

At 6-months-old, and after 12 h of fasting, the rats from the NF and OF groups were anesthetized with sodium thiopental (60 mg/kg, i.p.), and heparin was intravenously injected (500 UI/kg). Blood was collected from the abdominal aorta, and immediately centrifuged at 4 °C in order to separate the plasma. Samples were then stored at –80 °C until subsequent measurements. Thoracic aortas and hearts were quickly harvested to determine cardiovascular function and oxidative stress levels in tissues (see later).

2.3. Biochemical measurements

Blood glucose concentrations were determined by a glucometer, and plasma insulin, leptin and adiponectin were determined by EIA using specific commercial kits (Gentaur, Paris, France). Cholesterol was assayed on a Victor 1420 Multilabel Counter (Wallac-Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France) using a commercially available kit (Diasys, Condom, France).

2.4. Oxidative stress measurements

2.4.1. Plasma oxidative stress

Oxidative stress was determined in 10 µL of plasma by the free oxygen radical test (F.O.R.T, FORM-PLUS-3000, Optimabio, Ollioules, France). The colour intensity correlates directly with the amount of hydroperoxides and, consequently, with the level of oxidative stress [13].

Vitamin C content was assessed in 100 µL of plasma, stabilized by the addition of 200 µL of metaphosphoric acid (5%) and measured by high-performance liquid chromatography coupled with fluorimetric detection ($\lambda_{ex} = 360$ nm and $\lambda_{em} = 440$ nm) [14].

2.4.2. Antioxidant enzyme activity in the heart

After an *ex vivo* ischemia/reperfusion protocol, the hearts were frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until the subsequent measurement of ventricular antioxidant enzyme activity.

The general activity of superoxide dismutase (SOD) was measured in heart samples using a method described previously [15]. Catalase activity in the heart was measured using a modified method [16] derived from Aebi [17]. The activity of all cardiac enzymes was related to protein content determined by the Lowry method.

2.5. Susceptibility to *ex vivo* ischemia/reperfusion (I/R) injury

2.5.1. Preparation of isolated working hearts

The rat hearts were excised and placed in a cold (4 °C) perfusion buffer bath until contractions ceased. The hearts were perfused in the Langendorff mode at 37 °C with oxygenated (O₂/CO₂, 95%/5%) Krebs-Henseleit (pH 7.40) solution containing (in mmol/L) NaCl, 118; NaHCO₃, 25; KCl, 4.7; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂, 3; glucose, 5.5; at a constant hydrostatic perfusion pressure (55 mmHg). A catheter was inserted into the left ventricle and connected to a pressure transducer to measure the heart rate (HR) and left ventricular pressures: left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular end-systolic pressure (LVESP), left ventricular developed pressure (LVDP = LVESP–LVEDP), and the first derivative of LVDP, left ventricular maximal pressure development (+dP/dt) and relaxation (–dP/dt). The above cardiac parameters were calculated using specific software (A.D.E., Technolog21, Dijon, France). Then, an atrial cannula was inserted through the orifice of the pulmonary veins in order to perfuse the right atrium with a constant preload pressure of 15 mmHg in order to switch to the working mode. In this condition, the fluid was ejected by left ventricular contraction through the aortic root against a stable post-load pressure of 55 mmHg. Throughout each experiment, the coronary flow and aortic and cardiac output (calculated as a total of coronary and aortic output) were recorded.

2.5.2. Ischemia/reperfusion (I/R) protocol

The isolated hearts were perfused in the working (W) mode for 12 min, and then the perfusion was turned off in order to induce 30 min of total global normothermic ischemia, followed by reperfusion in the Langendorff (L) mode for 12 min and for 30 min in the W mode.

Samples of coronary effluents (50 µL) were collected during reperfusion and stored at 4 °C until further use (within 6 h). Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured using a kit (Promega, Charbonnières-Les-Bains, France). The accumulated amount of LDH released was obtained by integrating the area under the time-course curve. Results are expressed in arbitrary units (AU) per g of tissue.

2.6. Vascular reactivity

2.6.1. Coronary vasoreactivity test

The isolated hearts were perfused for 12 min in the L mode under constant pressure (55 mmHg), then for 12 min of L mode in constant flow conditions, for which the flow rate was adjusted in order to obtain the same aortic pressure as in the L preparation (55 mmHg). During this constant flow mode, coronary vasoreactivity was tested by the perfusion of bradykinin (BK 5.10^{–7} mol/L) and sodium

nitroprusside (SNP 10^{-6} mol/L). Coronary reactivity was evaluated through variations in aortic cannula pressure when the hearts were perfused in constant flow conditions. Coronary vascular resistance was calculated according to the formula: Coronary Resistance (CR) = Aortic Pressure (AP)/Coronary Flow (CF).

2.6.2. Vascular reactivity of the aorta

Aortic reactivity was measured in freshly excised thoracic aortas as described previously [18]. The functional integrity of the arterial rings was tested with KCl (60 mmol/L), and the presence or absence of functional endothelium was assessed by acetylcholine (ACh, 1 μ mol/L)-induced relaxation of aortic rings precontracted with phenylephrine (1 μ mol/L).

To assess vasoconstrictive responses, the rings were contracted with cumulative additions of phenylephrine (10^{-9} – $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L) or U46619 (analogue of the prostaglandin PGH₂, 10^{-10} – 10^{-6} mol/L). To assess vasorelaxation responses, the arteries were pre-contracted with phenylephrine (10^{-6} mol/L), and cumulative concentration–response curves for ACh (10^{-9} – $3 \cdot 10^{-5}$ mol/L) and SNP (10^{-10} – 10^{-5} mol/L) were constructed. Relaxation values were expressed as percentage decreases in phenylephrine-induced vasoconstriction.

2.7. Ventricular remodeling

2.7.1. Collagen content

Heart ventricles were fixed in 4% paraformaldehyde. Histological analysis was used to determine the development of cardiac fibrosis by staining of paraffin sections for total collagen with picosirius red. This was quantified using computerized image analysis (Image-J-1.43 software, Wayne-Rasband NIH, MA, USA), which was manually set to a detection level threshold. Ten fields were randomly chosen from each section of left ventricle, analysed by the same blinded experimenter, and the mean intensity was calculated. The percentage area was determined by calculating the positive stained area as a percentage of the total image area.

2.7.2. Matrix metallo-proteinase-2 (MMP-2) expression and activity

Total RNA was extracted from the ventricles with Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed with MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, id.) using random hexamers (Invitrogen, id.) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with 2 μ g of cDNA using the SYBR-Green PCR Master-Mix (Applied Biosystems) and both sense and anti-sense primers (5 μ mol/L) in a final volume of 20 μ L, in an 7500-Fast-Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The primers used for the amplification of rat MMP-2 were: forward 5'-GAGAAAAGCGCA GCGGAGTGACG-3', and reverse 5'-TTCCCCGCAAGCCCAAGTG-3'. Target gene expression was normalized against GAPDH gene expression.

Proteins were extracted from frozen heart tissue in a lysis buffer containing 250 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 200 mmol/L NaCl, Nonidet-P40 1%. Protein concentrations were determined by the Lowry method. The samples were mixed with SDS buffer without a reducing agent and 30 μ g of proteins were loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel containing 0.1% gelatine. After electrophoresis, the gels were incubated with 2.5% Triton X-100 for 2 times 30 min, and then incubated overnight at 37 °C with buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, and 10 mmol/L CaCl₂ and 0.02% Triton X-100, pH 7.4). The gels were stained with 0.1% Coomassie-brilliant-blue, and gelatinolytic activity was revealed as clear bands against a blue-stained background. Digestion bands were quantitated by an image analyser system (Image-J-1.43 software, Wayne-Rasband-NIH, MA, USA).

2.8. Statistical analysis

The results are expressed as mean values \pm SEM. For weight gain, food consumption and for the recovery of cardiac output, an ANOVA for repeated measures was performed to investigate differences between the two groups. For vascular reactivity, data

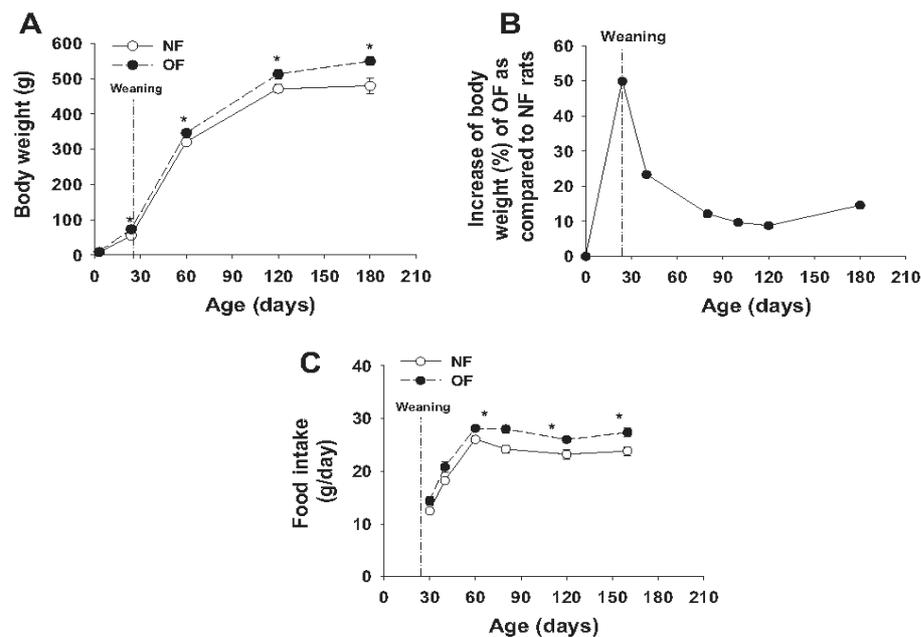


Fig. 1. Increase in body weight and food intake during life in NF and OF rats. Graph B shows the percentage of body weight increase in OF rats as compared to that in NF rats. Number of animals per group = 10. * $P < 0.05$ was considered significant (ANOVA for repeated measures).

Table 1

Metabolic parameters of NF and OF rats groups. Fasting blood glucose was assayed by glucometry; cholesterol and triglycerides were assayed using colorimetric methods and plasma insulin, leptin and adiponectin were estimated using ELISA. *P* was calculated by Student's *t*-test.

	NF	OF
Fasting glucose (mmol/L)	7.49 ± 0.32	8.30 ± 0.37 *
Cholesterol (g/L)	0.80 ± 0.03	0.88 ± 0.10
Triglycerides (g/L)	0.75 ± 0.08	0.90 ± 0.18
Insulin (mIU/L)	40.2 ± 8.8	67.0 ± 7.9 *
Leptin (ng/dL)	4.03 ± 0.48	5.84 ± 0.48 *
Adiponectin (µg/mL)	7.07 ± 0.55	5.12 ± 0.57 *

**P* < 0.05, NF vs. OF group.

were analysed using non-linear regression. For other data, the statistical significance of differences between two means was determined by a Student's *t*-test.

3. Results

3.1. Body weight and food consumption

Weight gain was significantly greater in overfed pups during the suckling period (Fig. 1A). At weaning (day 24), OF rats showed a 50% increase in body weight; the increase in body weight persisted into adulthood, but was less marked (10%) (Fig. 1B). This increase in body weight was associated with a significantly greater food intake (+15%) in OF than in NF rats (Fig. 1C). The heart weight of 6-month-old OF rats was also 10% higher than that of NF rats (1.29 ± 0.03 vs. 1.15 ± 0.05) but the heart weight/body weight ratio, a global marker of cardiac hypertrophy, was identical in the two groups.

3.2. Biochemical parameters

As shown in Table 1, we found a 10% increase in fasting blood glucose in 6-month-old OF rats. No significant difference was found between OF and NF rats concerning cholesterol and triglyceride levels. However, plasma levels of fasting insulin and leptin were significantly greater in OF rats than in NF rats (*p* < 0.05). In contrast, adiponectin levels were significantly lower in OF rats.

3.3. Oxidative stress in plasma and tissues

We found significantly higher plasma levels of hydroperoxides (Fig. 2A) and lower levels of plasma vitamin C (Fig. 2B) in the OF group than in the NF group.

In heart ventricular tissue, total SOD activity was significantly higher in the OF group than in the NF group (Fig. 2C). However, cardiac catalase activity in the OF rats (84.7 ± 2.7 IU/mg protein) was no different from that in NF rats (84.5 ± 2.3 IU/mg protein).

3.4. Heart's susceptibility to ischemia/reperfusion injury

Under baseline perfusion conditions, there was no difference between OF and NF rats for all of the cardiac parameters measured (Table 2). After 30 min of ischemia, reperfusing the myocardium led to a progressive but incomplete recovery of the heart's circulating and contractile activity. After 12 min of reperfusion in the L-mode and 30 min in the W-mode, the recovery of coronary flow was approximately 65% of the pre-ischemic values, while recovery of LVDP, +dP/dt and -dP/dt were 38%, 33% and 38%, respectively. For these parameters, hearts from NF rats and OF rats did not differ significantly. However, the recovery of cardiac output was significantly lower (38% vs. 65%, *p* < 0.05) in OF than in NF rats (Fig. 3A). In addition, the total amount of LDH, a marker of cell injury, released in the coronary effluent during the period of reperfusion, was found to be significantly higher in post-ischemic OF hearts than in NF hearts (Fig. 3B).

3.5. Vascular reactivity

In isolated hearts perfused in constant flow conditions, the perfusion of BK or SNP in the coronary vasculature led to a drop in aortic perfusion pressure consecutive to a decrease in coronary vascular resistance (Fig. 4). There was no difference between NF hearts and OF hearts for the coronary endothelium-dependent and independent response.

In isolated aortic tissue, the addition of increasing concentrations of phenylephrine or U46619 led to a gradual vasoconstrictive response, for which the aorta of NF or OF rats did not differ (Fig. 5A

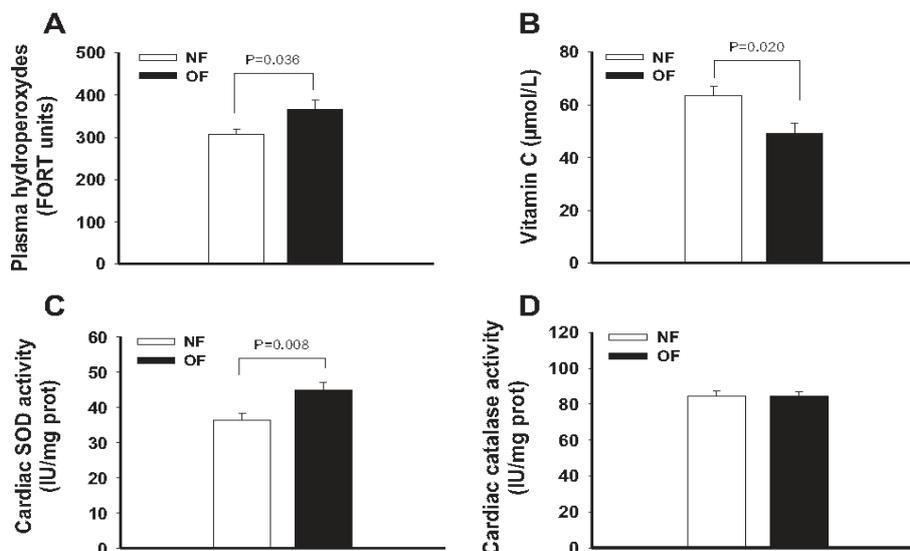


Fig. 2. Oxidative stress indexes in plasma and heart tissue. A: plasma hydroperoxydes. B: plasma vitamin C concentration. C: cardiac SOD activity. D: cardiac catalase activity.

Table 2
Pre-ischemic isolated heart parameters of normally fed (NF) or postnatal overfed (OF) 6-month-old rats. Parameters were recorded after 12 min in the Langendorff mode, (L 12) and after 12 min in the working mode (W12). P was calculated by Student's *t*-test.

	NF		OF	
	L 12	W 12	L 12	W 12
Coronary output (ml/min/g)	13.0 ± 0.5	12.1 ± 1.0	13.2 ± 0.7	15.3 ± 2.2
Cardiac output (ml/min/g)	13.0 ± 0.5	14.57 ± 1.94	13.24 ± 0.67	16.77 ± 2.52
LV developed pressure (mmHg)	66.9 ± 4.1	76.8 ± 6.2	66.8 ± 2.3	81.5 ± 6.3
+dP/dt (mmHg)	1796 ± 97	1886 ± 169	1785 ± 35	1988 ± 150
-dP/dt (mmHg)	-1163 ± 77	-1252 ± 142	-1152 ± 42	-1366 ± 139

and B). The addition of increasing concentrations of ACh or of SNP gradually relaxed precontracted arteries, showing the integrity of both endothelial and smooth muscle responses (Fig. 5A and B). No differences between the NF and OF groups were found for their aortic vasoreactivity (Fig. 5C and D).

3.6. Ventricular remodeling

Histological studies showed a higher collagen density (+54%) in the left and right ventricles of adult OF rat hearts (Fig. 6A and B). The analysis of MMP-2 expression by quantitative RT-PCR and activity by gelatine zymography in whole ventricles (left and right) showed an increase in both MMP-2 expression and activity in the ventricular tissue of OF rat hearts (Fig. 6C and D).

4. Discussion

Earlier studies suggested that obesity and overweight were important factors in the development of diabetes and in the aggravation of cardiovascular risk in adulthood.

The experimental model of postnatal OF (overfeeding) induced by reducing litter size is a newly described model of early nutritional disturbances, due to the greater availability of breast milk in the immediate postnatal period. These disturbances can lead to the development of immediate and long-term modifications not only in body weight and food intake, but also in several biochemical and metabolic abnormalities [4,19,20]. In our study, we found that POF induced a tremendous increase in body weight at weaning (+50%); the increase in body weight persisted into adulthood, though at a lower level (+10%), along with a permanent increase in food consumption (+15%). These observations are consistent with

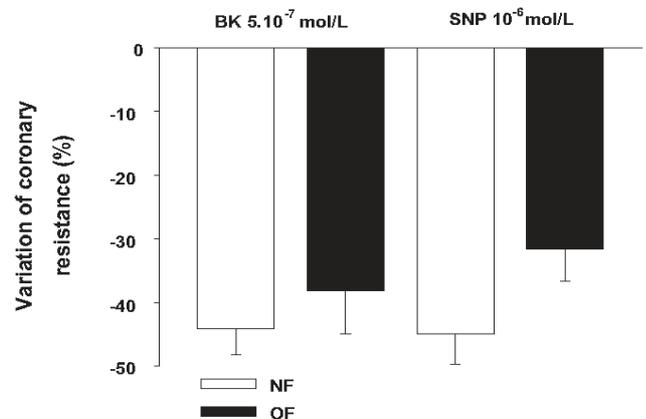


Fig. 4. Coronary vasoreactivity as measured by variations in coronary resistance in NF and OF isolated hearts: perfused in the presence of endothelium-dependent (BK 5.10⁻⁷ mol/L) and endothelium-independent (SNP 10⁻⁶ mol/L) vasodilators. Variations in coronary resistance are expressed in percentages.

earlier studies [21], with some differences that could be due to the number of pups per mother, strains and the composition of the standard diet.

Alterations in fasting glucose and an impaired insulin/glucose ratio were found in OF rats. This elevation of fasting glucose by postnatal OF is sometimes observed at weaning [7,22] and later in life [4,7], but this change does not seem to be constantly present in overfed rats [8,9,22–24]. Additionally, a rise in the insulin/glucose ratio is frequently reported [7,8,23,25], as is glucose intolerance [4,5,7,8,22,23]. Concerning plasma lipids, we found no modifications in fasting triglycerides and cholesterol levels in OF rats. Certain studies have shown not only an increase in plasma triglycerides and cholesterol in OF pups at weaning [26] and later [7], but also increases in circulating free fatty acid (FFA) [7,8].

Given that OF rats had increased adipose mass [5,7,23], we also assessed the plasma levels of two adipokines, leptin and adiponectin, at 180 days and found an increase in leptin and a decrease in adiponectin in OF rats. The increase in leptin levels in OF animals is constantly reported in the literature [6,7,9,22,23,27,28], and can be explained by the fact that leptin levels are related to the amount of fat mass. Concerning adiponectin, our results corroborate those obtained by Boullu-Ciocca and collaborators [8] at 150 days, but other studies showed no difference between OF and NF groups at 4 and 6 months [6,22].

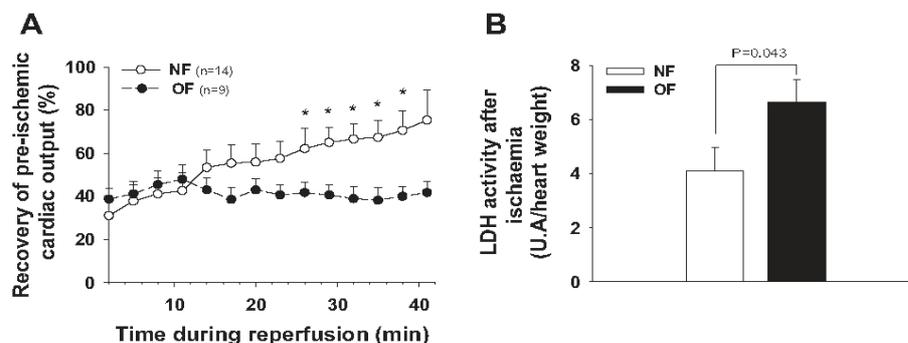


Fig. 3. Myocardial contractility parameters and tissue injury after ischemia. A: recovery of pre-ischemic cardiac output, **P* < 0.05 was considered significant (ANOVA for repeated measures). B: LDH activity in coronary effluent, a marker of the extent of necrosis. Hearts were subjected to 30 min of ischemia (37 °C) and 45 min of reperfusion.

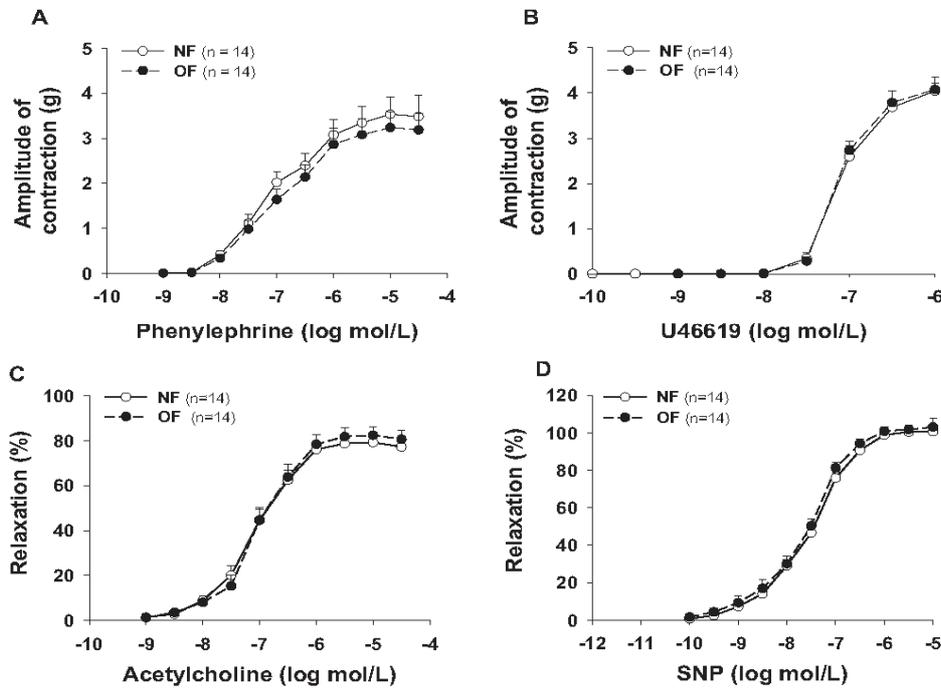


Fig. 5. Aortic reactivity of isolated thoracic aortas of NF or OF rats: subjected to different concentrations of vasoconstrictors and vasodilators. A: Phenylephrine, B: U46619 (analogue of the prostaglandin PGH_2), C: Acetylcholine, D: Sodium nitroprusside (SNP).

Obesity and overweight are associated with increased oxidative stress not only in the bloodstream, but also in myocardial tissue [29,30]. However, to date, no other study has explored the impact of OF on oxidative stress markers such as peroxidation products, or

vitamin or enzyme-related antioxidant defences. In our study, we evaluated circulating levels of hydroperoxides and vitamin C and found an increase in hydroperoxides and a decrease in vitamin C levels indicating increased circulating oxidative stress in OF rats.

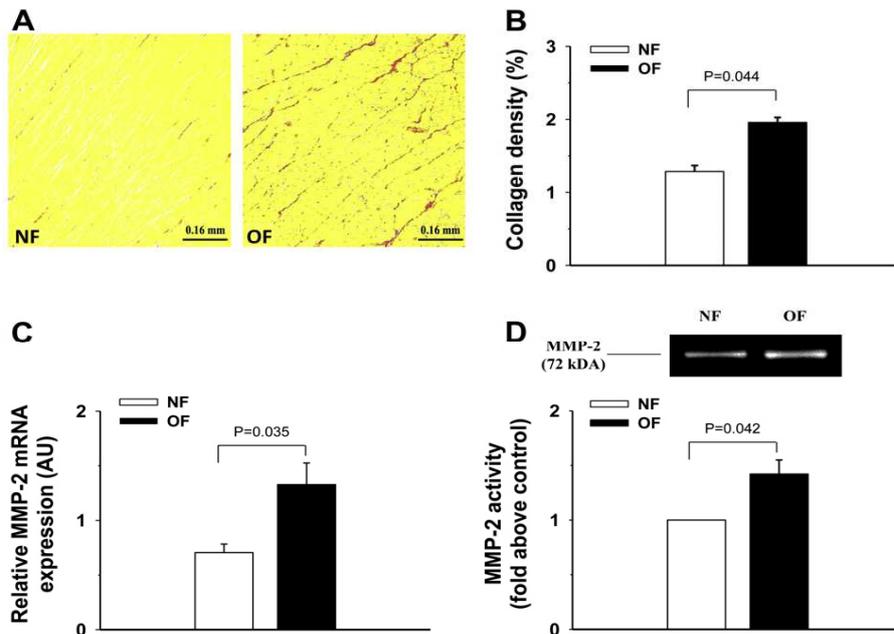


Fig. 6. Ventricular remodeling of hearts from NF or OF rats: A: representative picrosirius collagen staining of ventricular tissue. B: collagen density (% of area), C: MMP-2 mRNA expression (quantitative RT-PCR) and D: activity (gelatine zymography).

Unlike humans, rats synthesize their own vitamin C in the liver, but they can also ingest it in their food. However, intestinal transporters of ascorbate or dehydroascorbate are not very abundant in rodents except in gulonolactone oxidase-deficient strains [31,32] and there was no mention of levels of vitamin C in the composition of the standard diet we used in our study. Therefore, the decrease in vitamin C could be related to a greater depletion of this hydro-soluble antioxidant vitamin due to increased circulating oxidative stress, evidenced by higher levels of peroxidation markers. However, we cannot exclude the possibility of lower hepatic synthesis of vitamin C. This increase in oxidative stress cannot be explained by increased NADPH oxidase activity in vessels or tissues, since it was not modified in OF aortas or hearts (data not shown). In the context of overweight, other factors, such as a higher rate of mitochondrial oxidative activity, might explain an increase in oxidative stress. Paradoxically, we also found a significant increase in SOD activity in heart tissue homogenates, which could reflect an adaptive response to oxidative stress. In fact, some studies have demonstrated an association between obesity and increased myocardial oxidative stress [30]. Concerning the adaptive response, we previously showed in rats with major vitamin C deficiency, an up-regulation of several antioxidant and protective pathways such as CuZn and MnSOD [31].

Given the metabolic alterations and increased oxidative stress induced by postnatal overfeeding, we addressed the consequences of overfeeding on cardiovascular parameters. We first examined the recovery of pre-ischemic developed pressure, contractility and relaxation after I/R injury, and then aortic and coronary vasoreactivity. We found that postnatal OF induced greater susceptibility of the heart to ischemia-induced injury, as shown by a lower recovery of pre-ischemic cardiac output and an increase in cardiac LDH release and activity, indicating more severe cell damage. However, in our study, we found no significant differences in basal vascular parameters such as aortic and coronary vasoreactivity, or in levels of systemic arterial pressure (data not shown). Nevertheless, some studies have shown that a high-fat diet induces dysfunctions in endothelium-dependent vasorelaxation which can be restored by dietary antioxidants [33,34]. However, since rodents are known to have low plasma LDL and are not prone to developing atherosclerosis, wild-type rats may not be the ideal model to study the vascular consequences of moderate overweight, and future research should be conducted in genetically-modified models to overcome this problem. Therefore, two conclusions may be drawn from these contrasting results. In our model, the OF-induced metabolic and hormonal alterations were not severe enough to induce modifications of vascular reactivity, despite the increase in circulating markers of oxidative stress. However, in a stressful condition such as I/R injury, which generates a massive release of reactive oxygen species [35,36], the metabolic alteration induced by OF renders the myocardium more susceptible to injury. In addition, it is unlikely that this higher susceptibility is due to the restricted recovery of coronary perfusion (not modified in basal and post-ischemic conditions), and is therefore more probably related to impaired responses from the cardiomyocytes themselves. In keeping with this hypothesis, previous studies suggested that overfeeding in the neonatal period can induce left ventricular hypertrophy at 21 days [26] and increased cardiac fibrosis in 16-week-old adult hearts [28].

We therefore explored the possibility of ventricular remodeling and found both an increase in collagen content and an increase in MMP-2 expression and activity in the ventricles of OF rats, showing an alteration of the architectural organization of hearts from moderately overweight 6-months-old OF rats. Several environmental factors such as oxidative stress or increased leptin levels might explain the occurrence of this remodeling phenomenon.

Indeed, studies have highlighted the role of leptin and insulin in the elongation of cardiac myocytes [37], ventricular hypertrophy [38,39], and heart failure [40]. The accumulation of fibrous tissue, mainly type I and III collagen, is a major contributing factor in heart failure, and certain authors showed, in an angiotensin II model of non-hypertrophic remodeling [41], that rat hearts with accumulations of collagen similar to those observed in our study were more prone to ischemia-reperfusion injury. In fact, the accumulation of collagen could lead to increased stiffening of the myocardium, thus impairing diastolic filling of the ventricle (although we found no changes in ventricular function using *in vivo* echocardiography), which may hamper the recovery of cardiac output after ischemia.

5. Conclusion

To conclude, our study highlights OF-induced increases in circulating markers of oxidative stress, while showing for the first time that the myocardium of moderately overweight adult OF rats is more prone to ischemia-reperfusion injury, which may be explained, at least in part, by ventricular remodeling. These results suggest that the nutritional state in the immediate postnatal period should be taken into account since it may have an impact on cardiovascular risk in adulthood, even in moderately overweight individuals.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no personal, financial or other relationships with other people or organizations within 3 years of beginning the work submitted that could inappropriately influence, or be perceived to influence, the work submitted.

Funding source statement

This work was supported by grants from the French Ministry of Research and from the Regional Council of Burgundy.

Acknowledgments

The authors thank Mr P. Bastable for English revision of the manuscript, the French Ministry of Research and the Regional Council of Burgundy for funding and PhD granting, and Eve Rigal for technical assistance.

References

- [1] M. Zeller, P.G. Steg, J. Ravisy, Y. Laurent, L. Janin-Manificat, I. L'Huillier, J.C. Beer, A. Oudot, G. Rioufol, H. Makki, M. Farnier, L. Rochette, B. Verges, Y. Cottin, Prevalence and impact of metabolic syndrome on hospital outcomes in acute myocardial infarction, *Arch. Intern. Med.* 165 (2005) 1192–1198.
- [2] M. Zeller, P.G. Steg, J. Ravisy, L. Lorgis, Y. Laurent, P. Sicard, L. Janin-Manificat, J.C. Beer, H. Makki, A.C. Lagrost, L. Rochette, Y. Cottin, Relation between body mass index, waist circumference, and death after acute myocardial infarction, *Circulation* 118 (2008) 482–490.
- [3] K.L. Spalding, E. Arner, P.O. Westermark, S. Bernard, B.A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryden, J. Frisen, P. Arner, Dynamics of fat cell turnover in humans, *Nature* 453 (2008) 783–787.
- [4] A. Plagemann, T. Harder, A. Rake, M. Voits, H. Fink, W. Rohde, G. Dorner, Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galanergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats, *Brain Res.* 836 (1999) 146–155.
- [5] L.C. Balonan, H.P. Sheng, Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats, *Pediatr. Res.* 48 (2000) 668–673.
- [6] E. Velkoska, T.J. Cole, M.J. Morris, Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288 (2005) E1236–E1243.
- [7] S. Boullu-Ciocca, A. Dutour, V. Guillaume, V. Achard, C. Oliver, M. Grino, 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* 54 (2005) 197–203.
- [8] S. Boullu-Ciocca, V. Achard, V. Tassistro, A. Dutour, M. Grino, 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* 57 (2008) 669–677.
- [9] M. Lopez, L.M. Seoane, S. Tovar, M.C. Garcia, R. Nogueiras, C. Dieguez, R.M. Senaris, A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat, *Diabetologia* 48 (2005) 140–148.
- [10] F. Boubred, C. Buffat, J.M. Feuerstein, L. Daniel, M. Tsimaratos, C. Oliver, M. Lelievre-Pegorier, U. Simeoni, Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 293 (2007) F1944–F1949.
- [11] A. Galinier, A. Carriere, Y. Fernandez, C. Carpenne, M. Andre, S. Caspar-Bauguil, J.P. Thouvenot, B. Periquet, L. Penicaud, L. Casteilla, Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 12682–12687.
- [12] S. Furukawa, T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda, I. Shimomura, Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1752–1761.
- [13] A. Galinier, A. Carriere, Y. Fernandez, S. Caspar-Bauguil, B. Periquet, A. Periquet, L. Penicaud, L. Casteilla, Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats, *FEBS Lett.* 580 (2006) 6391–6398.
- [14] F. Tessier, I. Birlouez-Aragon, C. Tjani, J.C. Guillard, Validation of a micro-method for determining oxidized and reduced vitamin C in plasma by HPLC-fluorescence, *Int. J. Vitam Nutr. Res.* 66 (1996) 166–170.
- [15] A. Ecartot-Laubriet, L. Rochette, C. Vergely, P. Sicard, J.-R. Teyssier, The activation pattern of the antioxidant enzymes in the right ventricle of rat in response to pressure overload is of heart failure type, *Heart Dis.* 5 (2003) 308–312.
- [16] F. Dalloz, P. Maingon, Y. Cottin, F. Briot, J.-C. Horiot, L. Rochette, Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 785–800.
- [17] H. Aebi, Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [18] R. Debin, B. Lauzier, P. Sicard, S. Delemasure, S. Amoureux, L. Duvillard, C. Vergely, Y. Cottin, L. Rochette, Are Zucker obese rats a useful model for cardiovascular complications in metabolic syndrome? Physical, biochemical and oxidative stress considerations, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 23 (2009) 59–67.
- [19] R.A. Waterland, C. Garza, Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease, *Am. J. Clin. Nutr.* 69 (1999) 179–197.
- [20] S. Sivanandam, A.R. Sinaiko, D.R. Jacobs Jr., L. Steffen, A. Moran, J. Steinberger, Relation of increase in adiposity to increase in left ventricular mass from childhood to young adulthood, *Am. J. Cardiol.* 98 (2006) 411–415.
- [21] L. Kappeler, C. De Magalhaes Filho, P. Leneuve, J. Xu, N. Brunel, C. Chatziantoniou, Y. Le Bouc, M. Holzenberger, Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice, *Endocrinology* 150 (2009) 314–323.
- [22] A.L. Rodrigues, E.G. de Moura, M.C. Passos, I.H. Trevenzoli, E.P. da Conceicao, I.T. Bonono, J.F. Neto, P.C. Lisboa, Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 109–117.
- [23] A.C. Cunha, R.O. Pereira, M.J. Pereira, M. Soares Vde, M.R. Martins, M.T. Teixeira, E.P. Souza, A.S. Moura, Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2, *J. Nutr. Biochem.* 20 (2009) 435–442.
- [24] S. Rajia, H. Chen, M.J. Morris, Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers—modulation by postweaning diet, *J. Neuroendocrinol.* 22 (2010) 905–914.
- [25] A. Plagemann, T. Harder, A. Rake, K. Melchior, W. Rohde, G. Dorner, Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats, *Brain Res.* 818 (1999) 160–163.
- [26] A.S. Moreira, M. Teixeira Teixeira, F. da Silveira Osso, R.O. Pereira, G. de Oliveira Silva-Junior, E.P. Garcia de Souza, C.A. Mandarim de Lacerda, A.S. Moura, Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 19 (2009) 805–810.
- [27] R.O. Pereira, A.S. Moreira, L. de Carvalho, A.S. Moura, Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts, *Regul. Pept.* 136 (2006) 117–121.
- [28] E. Velkoska, T.J. Cole, R.G. Dean, L.M. Burrell, M.J. Morris, Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats, *J. Nutr.* 138 (2008) 1622–1627.
- [29] D.W. Laight, K.M. Desai, N.K. Gopaul, E.E. Anggard, M.J. Carrier, F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E, *Eur. J. Pharmacol.* 377 (1999) 89–92.
- [30] H.K. Vincent, S.K. Powers, D.J. Stewart, R.A. Shanely, H. Demirel, H. Naito, Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23 (1999) 67–74.
- [31] C. Vergely, C. Perrin, A. Laubriet, A. Oudot, M. Zeller, J.-C. Guillard, L. Rochette, Postischemic recovery and oxidative stress status of vitamin C-deficient rat hearts, *Cardiovasc. Res.* 51 (2001) 89–99.
- [32] C. Vergely, F. Goirand, A. Ecartot-Laubriet, C. Renard, D. Moreau, J.C. Guillard, M. Dumas, L. Rochette, Vitamin C deficiency exerts paradoxical cardiovascular effects in osteogenic disorder shionogi (ODS) rats, *J. Nutr.* 134 (2004) 729–735.
- [33] J. Sato, T. O'Brien, Z.S. Katusic, A. Fu, J. Nygren, R. Singh, K.S. Nair, Dietary antioxidants preserve endothelium dependent vasorelaxation in overfed rats, *Atherosclerosis* 161 (2002) 327–333.
- [34] J.F. Keaney Jr., J.M. Gaziano, A. Xu, B. Frei, J. Curran-Celentano, G.T. Shwaery, J. Loscalzo, J.A. Vita, Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90 (1993) 11880–11884.
- [35] C. Vergely, V. Maupoil, M. Benderitter, L. Rochette, Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on post-ischemic recovery during reperfusion, *Free Radic. Biol. Med.* 24 (1998) 470–479.
- [36] C. Vergely, A. Tabard, V. Maupoil, L. Rochette, Isolated perfused rat hearts release secondary free radicals during ischemia reperfusion injury. Cardiovascular effect of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron, *Free Radic. Res.* 35 (2001) 475–489.
- [37] Y. Abe, K. Ono, T. Kawamura, H. Wada, T. Kita, A. Shimatsu, K. Hasegawa, Leptin induces elongation of cardiac myocytes and causes eccentric left ventricular dilatation with compensation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292 (2007) H2387–H2396.
- [38] L. Perego, P. Pizzocri, D. Corradi, F. Maisano, M. Paganelli, P. Fiorina, M. Barbieri, A. Morabito, G. Paolisso, F. Folli, A.E. Pontiroli, Circulating leptin correlates with left ventricular mass in morbid (grade III) obesity before and after weight loss induced by bariatric surgery: a potential role for leptin in mediating human left ventricular hypertrophy, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 4087–4093.
- [39] S. Fredersdorf, C. Thumann, C. Ulucan, D.P. Griese, A. Luchner, G.A. Riegger, E.P. Kromer, J. Weil, Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats, *Cardiovasc. Pathol.* 13 (2004) 11–19.
- [40] P.C. Schulze, J. Kratzsch, A. Linke, N. Schoene, V. Adams, S. Gielen, S. Erbs, S. Moebius-Winkler, G. Schuler, Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure, *Eur. J. Heart Fail.* 5 (2003) 33–40.
- [41] M.B. Aljabri, T. Lund, A.C. Hoper, T.V. Andreasen, S. Al-Saad, S. Lindal, K. Ytrehus, Gene expression, function and ischemia tolerance in male and female rat hearts after sub-toxic levels of angiotensin II, *Cardiovasc. Toxicol.* 11 (2011) 38–47.

ARTICLE II

Early-induced overweight causes rapid changes in heart genomic expression and long-term cardiovascular, metabolic and oxidative alteration in mice

Ahmed Habbout¹, Eve Rigal¹, Julie Lorin¹, Charles Guenancia¹, Céline Fassot², Luc Rochette¹ and Catherine Vergely¹

¹Inserm UMR866, LPPCM, Faculties of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon, FRANCE

²Inserm UMR1083, Biologie neurovasculaire et mitochondriale Intégrée, Angers, FRANCE

^b Address correspondence to: Catherine Vergely, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardio-Métaboliques, INSERM UMR866, Université de Bourgogne, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 7 boulevard Jeanne d'Arc, BP87900, 21079 Dijon Cedex, France.

Phone: +33 3 80 39 34 60

Fax: +33 3 80 39 32 93

Email: cvergely@u-bourgogne.fr

Introduction

Clinical and experimental evidences indicate that the environment during the peri-natal period and the development plays a key role in regulating metabolic tendencies in adulthood, and that nutrition in early life has an impact on the subsequent risk of overweight, hypertension and insulin resistance (Spalding et al. 2008). Indeed, due to plasticity in gene expression, the neonatal period is critical for the orientation of phenotypic features in the adulthood, since some epigenetic modifications may permanently impact genomic expression and influence the development of chronic diseases. In this field, several groups showed that inducing early post-natal over-nutrition in rats, just by reducing litter sizes, led to profound changes in body weight at weaning (nearly 30% increase), which persisted at a lower level with maturation (10-15% increase) (Balonan and Sheng 2000; Plagemann et al. 1999; Velkoska et al. 2005). Recent data from our Laboratory (Habbout et al. 2012) allowed more in-depth comprehension of the cardiovascular and metabolic consequences of this overweight in rats, showing that a cluster of symptoms characteristic of metabolic syndrome occurred in neonatally overfed rats. Additionally, we were able to demonstrate that modifications of the cardiac redox environment occurred in adult overweighted rats.

In order to investigate the role of specific genes in the development of diseases, the use of transgenic mice is undeniably valuable. However, very few studies evaluated in mice the impact of post-natal overfeeding induced by litter reduction on cardio-metabolic and oxidative orientations in the adulthood. While much work has been done on the cardio-metabolic consequences of genetically db/db or ob/ob obese mice or of high-fat diets, limited research has been undergone on the cardiovascular consequences of simple moderate overweight (Kappeler et al. 2009). In this field, postnatal overfeeding might provide a good

experimental model for studying classical risk factors for cardiovascular disease associated with early-induced permanent overweight.

Therefore, the aim of our work was to evaluate the metabolic, oxidative and cardiovascular consequences of moderate overweight induced by post-natal over-nutrition in adult C57BL/6 mice. Additionally, the differential genetic expression in hearts from juvenile (post-weaning) overfed mice were compared to this of normally fed mice in order to determine early changes in genome expression that may be involved in late-coming differences in myocardial function.

Materials and Methods

Animals

Adult female C57BL/6 mice (Charles River, L'Arbresle, France) were caged with male mice at a proportion of 2:1, then housed in individual cages and given water and standard pellet diet *ad libitum* during pregnancy and lactation. On the second day of life, male pups were randomly distributed among the mothers to achieve cross-fostering and the litter size was adjusted to 10 male-pups (normal-fed, NF group), or reduced to 3 male-pups in order to induce postnatal overfeeding (over-fed, OF group). After weaning (day 24), mice of both groups had free access to standard diet (A03, SAFE Diets Augy, France) and water. The composition of the standard diet was 69% of cereals, 20% of vegetable proteins (soya), 6% of animal proteins (fish) and 5% of vitamins and minerals mixture, corresponding to 52% of carbohydrates, 21% of protein, 5% lipid and 4% of fibers as caloric intake. Throughout life, body weight and food intake were measured weekly then monthly. The local Ethics Committee approved the experimental protocol (n° 3710), and the investigators complied with authorization 21-CAE-024 of the French government. The investigation conforms to the 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)

Body composition

Whole body composition (fat mass, lean mass and water) was determined at 7 months in awake mice by using nuclear magnetic resonance technology with EchoMRI-700™

instrument (EchoMedical Systems, Houston, TX, USA), one week before sacrifice. Data were analyzed by manufacturer's software Windows XP Professional Edition, Microsoft.

Echocardiography and blood pressure measurement

Transthoracic echocardiography was performed two days before sacrifice at 7 months-old, using the Vevo770™ imaging system (VisualSonics Inc., Toronto, Canada), equipped with a 30 Mhz probe. Briefly, mice were anesthetized with isoflurane and their corporal temperature maintained at 37°C with infrared lamp and the heart was imaged in the long-axis and short-axis view of the left ventricle (LV), with 3 to 5 measurements for each view in order to make an average. The cursor of M-mode was positioned perpendicular to the anterior wall in order 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, fractional shortening (FS) and left ventricular ejection fraction (LVEF) were calculated.

In anesthetized mice, just before performing echocardiography, systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured with a validated tail-cuff method. For each mouse, averages of both SBP and DBP were calculated with 3 measurements

Plasma and tissue sampling

At either 24 days or 7-months old, and after 4-hours fasting, mice from NF and OF groups were anesthetized with sodium thiopental (60 mg/kg, i.p.), and heparin was injected (500 UI/kg, i.p.). Blood was collected from the abdominal aorta, and immediately centrifuged at 4°C in order to separate the plasma, and samples were stored at -80°C until subsequent measurements. Hearts were quickly harvested in order to determine either gene expression

(24-days or 7-months old), oxidative stress markers (7-months old), or to determine ex-vivo susceptibility to ischemia reperfusion injury (7 months old, separate set or mice group). After harvesting, hearts for gene expression and ventricular antioxidant activity were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until subsequent measurements.

Microarray analysis

Gene expression profile was performed on hearts of NF and OF mice at 24-days of age.

Extraction of total RNA

Total RNA was extracted from heart samples by Quiazol reagent (Invitrogen). The quality and concentration were checked by the Agilent technology. Eight samples in each age (four NF and four OF, from 24-days and 7-months old mice hearts) were isolated with sufficient yield and integrity for complete microarray analysis. Good-quality RNA was amplified and antisens RNA were coupled with Cy3 by the Low RNA input QuickAmp kit (Agilent Technologies), according to the manufacturer's instructions.

Hybridization on microarrays

Transcript profiling was performed using mouse Agilent 8×60k arrays. These microarrays contained distinct oligonucleotide probes (60 mers). The list of the probes is available online (<http://www.chem.agilent.com>). Microarrays hybridization with labeled-RNA were performed by the functional genomic platform of the Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (CNRS, Sophia-Antipolis, France). Data normalization was realized by quantile in order to level the magnitude of the measures Statistical analysis was performed with Limma (Linear Models for Microarray Data).

Biochemical measurements

Plasma glucose concentration was determined by a glucometer, plasma insulin, leptin, adiponectin and apelin were determined by EIA using specific commercial kits (Gentaur, Paris, France except for apelin Euromedex, Souffelweyersheim, France). Cholesterol was assayed on a Victor 1420 Multilabel Counter (Wallac-Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France) using a commercially available kit (Diasys, Condom, France).

Oxidative stress measurements

Plasma oxidative stress level

Oxidative stress was determined in 40 μ L of plasma by the free oxygen radical test (F.O.R.T, FORM-PLUS-3000, Optimabio, Ollioules, France). The color intensity correlates directly with the amount of hydroperoxide and, consequently, with the oxidative stress level (Galini r et al. 2006).

Measurement of reactive nitrogen-oxygen species in the heart using electron spin resonance (ESR) spectroscopy

Freshly harvested hearts were perfused with ice-cold Krebs-Henseleit buffer to remove residual blood. Myocardial biopsies of 3 mm diameter were cut, rinsed, weighed and placed in a 24-well tissue culture plate containing 200 μ L of ESR-specific pH 7.4 Krebs-HEPES buffer, containing (in mM) Na-HEPES 20; NaCl, 99; NaHCO₃, 25; KCl, 4.69; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.03; CaCl₂, 2.5; glucose, 5.6; in which deferoxamine (25 μ M) and diethyl-dithiocarbamate (5 μ M) were added to remove traces of contaminant metal ions. The spin

probe 1-hydroxy-3-methoxy-carbonyl-2,2,5,5- tetramethyl pyrrolidine (CMH) was added in order to reach a final concentration of 100 μ M, then the tissue was incubated for 15 minutes at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere, in presence of CMH. In the presence of reactive nitrogen-oxygen species, the ESR-silent CMH hydroxylamine is oxidized into CP[•] nitroxide radical with a characteristic 3 line signal appearance. Supernatant and tissue were then collected and immediately frozen in liquid nitrogen in ESR-compatible polyethylene tubes. Frozen tissue and medium were analyzed at 100K in a Bruker X-band EMX spectrometer (Wissembourg, France) using a HS cavity, with the following recording parameters: amplitude modulation 5 gauss, frequency modulation 100 kHz, gain 2.10^{+5} , time constant 328 ms, conversion time 40.96 ms, microwave frequency 9.37 GHz, field sweep 100 G, attenuation 10 dB.

The height of the central anisotropic peak of CP signal was measured (in arbitrary units, AU) and results were expressed in AU/mg of fresh tissue.

Antioxidant enzyme activity in the heart

Superoxide dismutase (SOD) was measured in heart samples using a method described previously (Ecarnot-Laubriet et al. 2003). Catalase activity in the heart was measured using a modified method (Daloz et al. 1999) derived from Aebi and Clairbone (Aebi 1984). All cardiac enzyme activities were related to protein content determined by the Lowry method.

Susceptibility to *ex vivo* Ischemia/Reperfusion (I/R) injury

Preparation of isolated working hearts

After the mice had been anesthetized with sodium thiopental (60 mg/kg, i.p.) and heparin injection (see previously), the hearts were excised and placed in a cold (4°C) perfusion buffer bath until contractions ceased. The hearts were cannulated in the Langendorff mode, and

perfused at 37°C with oxygenated (O₂/CO₂, 95%/5%), Krebs-Henseleit (pH 7.40) solution containing (in mM) NaCl, 112; NaHCO₃, 25; KCl, 5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂, 1.5; glucose, 5.5; at a constant hydrostatic perfusion pressure (55 mmHg). Hearts resumed beating almost immediately on rewarming. Total time from excision of the hearts to initiation of Langendorff perfusion did not exceed 3 minutes. A water-filled cellophane balloon was inserted into the left ventricle and connected to a pressure transducer to measure heart rate (HR) and left ventricular pressures: left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), left ventricular end-systolic pressure (LVESP), left ventricular developed pressure (LVDP=LVESP-LVEDP), and the first derivative of LVDP, left ventricular maximal pressure development (+dP/dt) and relaxation (-dP/dt). The above cardiac parameters were calculated using software (A.D.E., Technolog21, Dijon, France) developed in collaboration with computer and electronics scientists. The heart was placed in a thermostated chamber filled with Krebs-Henseleit solution maintained at 37°C. The coronary flow (volume of buffer overflowed out of isolated heart chamber during 1 min) was measured throughout the experiments.

Ischemia/Reperfusion (I/R) protocol

The isolated hearts were initially perfused for 20 minutes of stabilization in the Langendorff (L) mode. Then recording of cardiac parameters started for 12 min, and then the perfusion was turned off in order to induce 30 min of total global normothermic ischemia, that was followed by reperfusion in the Langendorff (L) mode for 2 hours.

Infarct size

At the end of 2 h of reperfusion, the hearts were cut into five transverse slices, each about 1 mm thick. Then, these slices were incubated in triphenyl tetrazolium chloride (TTC) solution in phosphate buffer (pH 7.4, 37°C) during 20 minutes. After incubation in TTC, the slices

were photographed from both sides and contoured with image analysis software (Histolab) to delineate the borders of the entire heart and infarcted area (white). The infarct size was calculated as percentage of the total myocardial area.

Ventricular remodeling

Collagen content

Freshly harvested heart ventricles were fixed in 4% paraformaldehyde. Histological analysis was used to determine the development of cardiac fibrosis by staining of paraffin sections for total collagen with picrosirius red. This was quantified using computerized image analysis (Image-J-1.43 software, Wayne-Rasband NIH, MA, USA), which was manually set to a detection level threshold. Ten fields were randomly chosen from each section of left ventricle, analysed by the same blinded experimenter, and the mean intensity was calculated. The percentage area was determined by calculating the positive stained area as a percentage of the total image area.

Matrix metallo-proteinase-2 (MMP-2) expression and activity

mRNA (1 µg) was reverse transcribed with MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, id.) using random hexamers (Invitrogen, id.) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with 2 µl of cDNA using the SYBR-Green PCR Master-Mix (Applied Biosystems) and both sense and antisense primers (5 µM) in a final volume of 20 µL, in an 7500-Fast-Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The primers used for the amplification of mouse MMP-2 were: forward 5'-GAGAAAAGCGCAGCGGAGTGACG-3', and reverse 5'-TTCCCCCGCAAGCCCAAGTG-3'. Target gene expression was normalized against GAPDH gene expression.

Proteins were extracted from frozen heart tissue in lysis buffer containing 250 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, Nonidet-P40 1%. Protein concentrations were determined by the Lowry method. Samples were mixed with SDS buffer without a reducing agent and 30 µg of proteins were loaded onto a 10% SDS-polyacrylamide gel containing 0.1% gelatin. After electrophoresis, the gels were incubated with 2.5% Triton X-100 for 2 times 30 min, and then incubated overnight at 37°C with buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, and 10 mM CaCl₂ and 0.02% Triton X-100, pH 7.4). The gels were stained with 0.1% Coomassie-brilliant-blue, and gelatinolytic activity was revealed as clear bands against a blue-stained background. Digestion bands were quantitated by an image analyzer system (Image-J-1.43 software, Wayne-Rasband-NIH, MA, USA).

Statistical analysis

The results are expressed as mean values \pm SEM. The statistical significance of differences between two means was determined by a Student's *t*-test. For weight gain a repeat ANOVA was performed to investigate differences between the two groups.

Results

Body weight and body composition

Weight gain was significantly greater in overfed pups during the suckling period (figure 1A). At weaning (day 24), OF mice showed a 30% increase in body weight which persisted at this level with maturation (figure 1B). This increase of body weight was associated with a significant increase of body fat mass (+47%) along with a decrease of lean mass (-7%) in OF mice (figure 1C).

Biochemical parameters

As shown in Table 1, we observed a 15% increase in total cholesterol in 7-month-old OF mice. Plasma levels of fasting insulin and leptin were also significantly greater in OF mice than in NF mice ($p < 0.05$). Fasting plasma glucose, adiponectin and apelin was not different between the two groups.

Microarrays analysis.

RNA samples of 24-days hearts were analyzed. At 24-days, we isolated 822 genes differentially expressed between OF and NF mice (with $p < 0.05$). Using $\log_2 \text{signal} < 7 + |\log_2 \text{ratio}| > 0.7 + \text{lodScore} > 2$ as new filter, we restricted our results to 102 targets corresponding to 35 down-expressed and 67 over-expressed genes; the full list of these 102 genes classified according to the seven functional categories described by Hwang et al. (Hwang et al. 1997), is presented in Data Supplement Table 1. Among these 102 genes differentially expressed, structural genes representing 12% of overexpressed genes, principally collagen encoded genes (Table 2). Moreover we noted that apelin receptor's (APJ)

gene was strongly overexpressed (ratio: 1.80, $p=0.012$) and its intracellular negative regulator, Rab7, tends to be under-expressed (ratio=0,80, $p=0,032$).

Oxidative stress measurements in plasma and tissues

We observed significantly higher plasma levels of hydroperoxide (figure 2A) in the OF group than in the NF group.

In heart ventricular tissue, a characteristic anisotropic signal corresponding to the oxidation of CMH into CP[•] nitroxide radical by reactive nitrogen-oxygen species was observed (figure 2C). After quantification of the signals, a tremendous increase (+79%) in CMH oxidation was observed in myocardial biopsies from OF mice (figure 2B).

In heart ventricular tissue, SOD and catalase activities were significantly higher in the OF group than in the NF group (figure 2D and 2E).

In vivo cardiac and vascular function

In 7-months-old anesthetized mice, a small (+10 mmHg) but significant increase in diastolic, systolic and mean arterial blood pressure was observed in the OF group (figure 3). Heart rate was not different between the groups, however, the measurement of left ventricular end-diastolic and end-systolic diameters showed an enlargement of both of these dimensions in 7-months-old OF mice (figure 4A and B). Heart weight of OF mice, measured after mice's sacrifices, was scarcely greater, but the heart to body weight ratio, a measurement of heart hypertrophy, was not modified in OF mice. Interestingly, ejection fraction, the proportion of

left ventricular end-diastolic volume that is efficiently ejected through the aorta during the systole, was reduced in OF mice's hearts (figure 4C).

Heart's susceptibility to ischemia/reperfusion injury

In baseline perfusion conditions, there was no difference between OF and NF mice in all of the cardiac parameters measured. After 30 minutes of ischemia, reperfusion of the myocardium led to a progressive but incomplete recovery of the heart's circulating and contractile activity. In OF mice's hearts, the recovery of coronary flow (figure 4A) of LVDP (figure 4B), $+dP/dt$ and $-dP/dt$ were significantly impaired in comparison with these of NF mice. In addition, the evaluation of still viable (red) and necrotic zones (white) after 2 hours of reperfusion showed a major increase in infarcted areas in OF hearts (figure 4D). Consequently, the percentage of infarcted left ventricle was dramatically increased in OF mice's hearts (+74%, figure 4C).

Ventricular remodeling

In intact hearts, histological studies showed a higher collagen density in adult OF mice ventricles (Figure 6A and 6B). The analysis of MMP-2 expression by quantitative RT-PCR and activity by gelatin zymography showed an increase in both MMP-2 expression (figure 6C) and activity (figure 6D) in OF mice heart ventricular tissue.

Discussion

Our results show for the first time that changes in the nutritional environment during the postnatal period induces changes in heart gene expression that possibly will have a long-term effect on cardiovascular function and heart structure in adult mice; and may have a deleterious impact on myocardial injury recovery after an ischemic insult.

Over-nutrition during the perinatal period has been associated with susceptibility to overweight, obesity and related comorbidities. Although infancy has not been the target of overweight/obesity prevention, several observations have shown that rapid weight gain in infancy may influence weight later in life as well as the future development of adult cardiovascular diseases (Stettler et al. 2005). In most mammals, developmental plasticity, the concept that organ development is not complete at birth and continues in the immediate postnatal period, allows the offspring the ability to adapt to changes in the environment. Metabolic mal-programming of vital regulatory pathways may however occur as a response to an altered nutritional experience during the immediate postnatal life, a period that may be considered as a vulnerable time for permanent mal-programming of appetite and growth dynamics. Rodents raised in small litters have been confirmed to be a useful experimental model for the study of consequences of early over-nutrition, due to the greater availability of breast milk in the critical immediate postnatal period. These disturbances can lead to the development of immediate and long-term modifications not only in body weight and food intake, but also of several biochemical and metabolic abnormalities (Plagemann et al. 1999; Sivanandam et al. 2006; Waterland and Garza 1999).

Our study affords new original data putting in evidence that nutritional changes in the immediate postnatal life, such as overnutrition, may influence the expression of several genes

involved in heart structural organization (collagens, myosin, actin, dystrophin, dynein ...) metabolism (insulin-growth factors) , vasoreactivity (endothelin-1 and receptor), cell signaling/communication and oxidative stress (glutathione S-transferase). It is noteworthy that these changes were obtained in pups that were randomly assigned to either small or large litters, and that changes might not be related to genetic differences due to distinct ascendants. Therefore, in only 24 days of increased milk consumption, myocardial genome expression was modified in overfed mice and may have induced some permanent changes in cardiomyocytes cytoskeleton structure and in myocardial cardiomyocyte organization. Indeed, microarrays were processed in whole heart ventricles, which contain several types of cells such as endothelial, vascular smooth muscle and fibroblastic cells in addition to cardiomyocytes. Thus, additional data are now necessary to confirm at the mRNA and protein levels the changes detected by microarrays, but also to determine which cell type is concerned by these modifications.

In the present study, we found that postnatal over-feeding (OF) induced a significant increase in body weight at weaning (+30%) which persisted at the same level with maturation. Interestingly, this increase in body weight was found to be related to an elevation of body fat mass, at the expense of lean mass. Experimental evidence during mice's sacrifice showed that adipose tissue deposition was mainly visceral but not subcutaneous, being in favor of the concept of "central adiposity". These observations concerning increase in body weight are consistent with an earlier study (Kappeler et al. 2009), with some differences that could be due to the number of pups per mother, strains and composition of the standard diet.

Postnatally overfed mice displayed alterations in some biochemical parameters, such as increased plasma insulin and cholesterol. Our results confirm a previous study performed in

12 months-old mice (Kappeler et al. 2009) showing increases in HDL-cholesterol, triglycerides and free fatty acids. In this previous study as in ours, no modifications in fasting glucose was observed, despite alterations in glucose tolerance and a major increase in plasma insulin at weaning and later. In fact, hyperinsulinemia starts in the earliest stages of life in OF pups, and lead to permanent insulin resistance at both the hypothalamic (Davidowa and Plagemann 2007) and peripheral (Pereira et al. 2006) levels.

Given that OF mice had increased adipose mass, we also assessed the plasma levels of some adipokines, such as leptin, adiponectin and apelin and found an increase in leptin in OF mice and no variations of adiponectin and apelin levels. It is well known that increase in central adiposity represents a significant risk factor for cardiovascular disease and may influence survival in subjects with coronary artery disease (Coutinho et al. 2011). Indeed, adipose tissue is able to secrete a plethora of peptides, named adipocytokine, which act in endocrine, paracrine or autocrine modes to influence a diverse array of biological functions, some of them being clearly involved in the development of cardiovascular disease (Smith and Yellon 2011). Leptin is produced primarily by white adipose tissue and levels of leptin are directly proportional to whole body adipose mass. Leptin plays a major role in the regulation of appetite and energy balance, but it induces also a variety of actions in the cardiovascular system. The increase in leptin levels in OF rats (Boullu-Ciocca et al. 2005; Cunha et al. 2009; Lopez et al. 2005; Pereira et al. 2006; Rodrigues et al. 2011; Velkoska et al. 2005; Velkoska et al. 2008) or mice (Kappeler et al. 2009) is constantly reported in the literature, and can be explained by the fact that leptin levels are related to the amount of fat mass. Though OF mice have increased circulating levels of leptin, previous studies suggested in rats that overfeeding may induce central leptin resistance, due to lower Ob-Rb expression in hypothalamic nucleus (Lopez et al. 2005; Rajia et al. 2010)

Concerning adiponectin, results are less consensual, but previous studies performed in rats showed no difference at 4 and 6 months between OF and NF groups (Rodrigues et al. 2011; Velkoska et al. 2005). Adiponectin production is inversely proportional to whole body adipose mass, and experimental studies suggest that it modulates the action of insulin and thus improves insulin sensitivity in peripheral tissues (Matsuzawa 2006) and induces general cardioprotective effects (Gualillo et al. 2007).

Apelin is an adipocytokine that is rapidly gaining in significance (Castan-Laurell et al. 2011). Apelin and its G-protein coupled receptor, APJ, are expressed in various tissues and play roles in fluid balance, satiety and immune function. Apelin is present in plasma at levels ranging between 0.2 and 1.5 ng/mL. In the cardiovascular system, apelin and APJ are abundantly expressed in the heart, APJ being predominantly expressed in cardiomyocytes (Kleinz et al. 2005) whilst apelin was shown to be present in endocardial endothelial cells (Kleinz and Davenport 2004). Indeed, cardiovascular function has been reported to be mediated, in part, by the apelin/APJ system. For instance, apelin increases endothelium-dependent vasodilation (Tatemoto et al. 2001) and was found to exhibit powerful inotropic activity (Berry et al. 2004). Additionally, apelin may play an important role in cardiomyocyte specification and heart development (Scott et al. 2007).

Obesity and overweight are associated with increased oxidative stress not only in the bloodstream, but also in myocardial tissue (Laight et al. 1999; Vincent et al. 1999). In a previous study performed in rats in our group (Habbout et al. 2012), we observed an increase in plasma hydroperoxides and a decrease in vitamin C levels indicating enhanced circulating oxidative stress and the present work in OF mice confirms these initial data. Moreover, postnatal over-nutrition in mice also induced an increase in oxidative stress levels in the adult

myocardial tissue, as evidenced by our ESR spectroscopy investigations. ESR is one of the few techniques which allow the direct measurement of free radical species; however most of biological reactive oxygen and nitrogen species (RONS) of interest are too short-lived to be measured directly with ESR spectroscopy. Hydroxylamine spin-probes such as CMH can be oxidized by superoxide anion or peroxynitrite, giving rise to a more stable long-lived ESR-detectable CP^{\bullet} nitroxide, allowing detection of these unstable species in cell cultures or isolated organs (Delemasure et al. 2007; Oudot et al. 2006). This observation of increased nitro-oxidative stress in myocardial tissue of postnatally OF mice is a very original finding, confirming the association between obesity and increased myocardial oxidative stress (Vincent et al. 1999). We also observed a significant increase in the antioxidant SOD and CAT activities in heart tissue homogenates, a paradoxical result at first sight, which could rather reflect the adaptive response to increased oxidative stress.

Since postnatally overfed mice displayed metabolic alterations and increased oxidative stress, we addressed the consequences on cardiovascular parameters. Firstly, early postnatal over-nutrition led to modifications of basal cardiovascular parameters in anesthetized mice, such as a discrete elevation of arterial blood pressure, an enlargement of ventricular diameters, and impairment in left ventricular ejection fraction. To date, none of these modifications have been reported for overweighted mice.

Secondly, we explored the possibility of ventricular remodeling and found both an increase in collagen content and an increase in MMP-2 expression and activity in the ventricles of OF mice, showing an alteration of the architectural organization of hearts from overweight 7-months-old OF mice, reinforcing our previous data obtained in rats (Habbout et al. 2012). Several environmental factors such as oxidative stress or increased leptin levels might explain

the occurrence of this remodeling phenomenon. Indeed, studies have highlighted the role of leptin and insulin in the elongation of cardiac myocytes (Abe et al. 2007), ventricular hypertrophy (Fredersdorf et al. 2004; Perego et al. 2005), and heart failure (Schulze et al. 2003).

Thirdly, we examined the recovery of pre-ischemic coronary flow, ventricular developed pressure, contractility and relaxation after I/R injury performed *ex vivo* in isolated hearts, without any potential influence of neuro-humoral regulatory pathways. We found that postnatal-OF induced higher susceptibility of the heart to ischemia-induced injury, as shown by a lower recovery of all of the pre-ischemic cardiac parameters and a dramatic increase in infarct size. Therefore, in a stressful condition such as I/R injury, which generates a massive release of reactive oxygen-nitrogen species (C Vergely et al. 1998; Catherine Vergely et al. 2001), the metabolic alterations induced by OF renders the myocardium more susceptible to damage.

At this time of the discussion, a cautionary note should therefore be pointed concerning the use of transgenic animals in order to evaluate the potential role of certain key proteins genes and their impact on myocardial recovery after ischemia-reperfusion injury. Indeed, due to difficulties in breeding, transgenic mice are frequently raised in small litters, and compared to their wild-type control mates, raised in normal (large) litters. In view of our present data, caution should be done to compare transgenic and wild-type mice originating from litters of equal numbers. Otherwise, some of the negative impacts of inactivating or up-regulating a gene in transgenic mice could only be due to the long-term cardio-metabolic consequences of nutritional differences during the critical postnatal period.

To conclude, our study emphasizes that over-nutrition during the immediate postnatal period in mice leads to early changes in heart gene expression, that may permanently modify its structural organization and metabolism inducing late-coming increases in myocardial markers of oxidative stress in adult mice, but also to alterations of cardiovascular function and structure which are very likely to be involved in the higher susceptibility to myocardial injury after an ischemic insult. These results suggest that the nutritional state in the immediate postnatal period should be taken into account since it may have an impact on cardiovascular risk in adulthood, and especially in the context of transgenic mice that may be bred in small litters.

Funding

This work was supported by grants from the French Ministry of Research and from the Regional Council of Burgundy.

Acknowledgments:

The authors thank Mr. P. Bastable for English revision of the manuscript, the French Ministry of Research and the Regional Council of Burgundy for funding and PhD granting. The authors thank Françoise Bechet for technical assistance, Dr. Carole Richard and Dr. Stéphanie Delemasure-Chalumeau for help in performing echocardiography, Dr. Philippe Besnard and Dr. J.-F. Merlin for help in performing Echo-MRI.

Conflict of interest: none

References

1. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453:783-787
2. Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, Dorner G. 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;836:146-155
3. Balonan LC, Sheng HP. Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats. *Pediatr Res*. 2000;48:668-673
4. Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. Early dietary intervention: Long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide y, and adiposity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288:E1236-1243
5. Habbout A, Delemasure S, Goirand F, Guillard JC, Chabod F, Sediki M, Rochette L, Vergely C. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie*. 2012;94:117-124
6. Kappeler L, De Magalhaes Filho C, Leneuve P, Xu J, Brunel N, Chatziantoniou C, Le Bouc Y, Holzenberger M. Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice. *Endocrinology*. 2009;150:314-323
7. Duong Van Huyen JP, Vessieres E, Perret C, Troise A, Prince S, Guihot AL, Barbry P, Henrion D, Bruneval P, Laurent S, Lelievre-Pegorier M, Fassot C. In utero exposure to maternal diabetes impairs vascular expression of prostacyclin receptor in rat offspring. *Diabetes*. 2010;59:2597-2602
8. Galinier A, Carriere A, Fernandez Y, Caspar-Bauguil S, Periquet B, Periquet A, Penicaud L, Casteilla L. Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats. *FEBS Lett*. 2006;580:6391-6398
9. Ecartot-Laubriet A, Rochette L, Vergely C, Sicard P, Teyssier J-R. The activation pattern of the antioxidant enzymes in the right ventricle of rat in response to pressure overload is of heart failure type. *Heart Disease*. 2003;5:308-312
10. Dalloz F, Maingon P, Cottin Y, Briot F, Horiot J-C, Rochette L. Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat. *Free Radic Biol Med*. 1999;26:785-800
11. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121-126
12. Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, Rezvani M, Barrans JD, Dai KS, Wang HY, Ma H, Cukerman E, Liu YQ, Gu JR, Zhang JH, Tsui SK, Waye MM, Fung KP, Lee CY, Liew CC. A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: Toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation*. 1997;96:4146-4203
13. Stettler N, Stallings VA, Troxel AB, Zhao J, Schinnar R, Nelson SE, Ziegler EE, Strom BL. Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: A cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation*. 2005;111:1897-1903
14. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999;69:179-197

15. Sivanandam S, Sinaiko AR, Jacobs DR, Jr., Steffen L, Moran A, Steinberger J. Relation of increase in adiposity to increase in left ventricular mass from childhood to young adulthood. *Am J Cardiol.* 2006;98:411-415
16. Davidowa H, Plagemann A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport.* 2007;18:521-524
17. Pereira RO, Moreira AS, de Carvalho L, Moura AS. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. *Regul Pept.* 2006;136:117-121
18. Coutinho T, Goel K, Correa de Sa D, Kragelund C, Kanaya AM, Zeller M, Park JS, Kober L, Torp-Pedersen C, Cottin Y, Lorgis L, Lee SH, Kim YJ, Thomas R, Roger VL, Somers VK, Lopez-Jimenez F. Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: A systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:1877-1886
19. Smith CC, Yellon DM. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol Ther.* 2011;129:206-219
20. Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. 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;54:197-203
21. Cunha AC, Pereira RO, Pereira MJ, Soares Vde M, Martins MR, Teixeira MT, Souza EP, Moura AS. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of glut-2. *J Nutr Biochem.* 2009;20:435-442
22. Lopez M, Seoane LM, Tovar S, Garcia MC, Nogueiras R, Dieguez C, Senaris RM. A possible role of neuropeptide y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia.* 2005;48:140-148
23. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Trevenzoli IH, da Conceicao EP, Bonono IT, Neto JF, Lisboa PC. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher socs3 expression and lower stat3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem.* 2011;22:109-117
24. Velkoska E, Cole TJ, Dean RG, Burrell LM, Morris MJ. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. *J Nutr.* 2008;138:1622-1627
25. Rajia S, Chen H, Morris MJ. Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. *J Neuroendocrinol.* 2010;22:905-914
26. Boullu-Ciocca S, Achard V, Tassistro V, Dutour A, Grino M. 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;57:669-677
27. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett.* 2006;580:2917-2921
28. Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: Physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:275-283
29. Castan-Laurell I, Dray C, Attane C, Duparc T, Knauf C, Valet P. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine.* 2011;40:1-9

30. Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport AP. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, apj, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul Pept.* 2005;126:233-240
31. Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept.* 2004;118:119-125
32. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept.* 2001;99:87-92
33. Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, Burdick J, Morine KJ, Gardner TJ, Woo YJ. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation.* 2004;110:II187-193
34. Scott IC, Masri B, D'Amico LA, Jin SW, Jungblut B, Wehman AM, Baier H, Audigier Y, Stainier DY. The g protein-coupled receptor agtr1b regulates early development of myocardial progenitors. *Developmental cell.* 2007;12:403-413
35. Laight DW, Desai KM, Gopaul NK, Anggard EE, Carrier MJ. F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese zucker rat: Effects of vitamin e. *Eur J Pharmacol.* 1999;377:89-92
36. Vincent HK, Powers SK, Stewart DJ, Shanely RA, Demirel H, Naito H. Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23:67-74
37. Oudot A, Martin C, Busseuil D, Vergely C, Demaison L, Rochette L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:2214-2222
38. Delemasure S, Sicard P, Lauzier B, Moreau D, Vergely C, Rochette L. Acute administration of epirubicin induces myocardial depression in isolated rat heart and production of radical species evaluated by electron spin resonance spectroscopy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50:647-653
39. Abe Y, Ono K, Kawamura T, Wada H, Kita T, Shimatsu A, Hasegawa K. Leptin induces elongation of cardiac myocytes and causes eccentric left ventricular dilatation with compensation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H2387-2396
40. Perego L, Pizzocri P, Corradi D, Maisano F, Paganelli M, Fiorina P, Barbieri M, Morabito A, Paolisso G, Folli F, Pontiroli AE. Circulating leptin correlates with left ventricular mass in morbid (grade iii) obesity before and after weight loss induced by bariatric surgery: A potential role for leptin in mediating human left ventricular hypertrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:4087-4093
41. Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol.* 2004;13:11-19
42. Schulze PC, Kratzsch J, Linke A, Schoene N, Adams V, Gielen S, Erbs S, Moebius-Winkler S, Schuler G. Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2003;5:33-40
43. Vergely C, Maupoil V, Benderitter M, Rochette L. Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on post-ischemic recovery during reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:470-479
44. Vergely C, Tabard A, Maupoil V, Rochette L. Isolated perfused rat hearts release secondary free radicals during ischemia reperfusion injury.

- Cardiovascular effect of the spin trap alpha-phenyl *n*-tert-butyl nitron. *Free Radic Res.* 2001;35:475-489
45. Yim HE, Ha KS, Bae IS, Yoo KH, Hong YS, Lee JW. Postnatal early overnutrition dysregulates the intrarenal renin-angiotensin system and extracellular matrix-linked molecules in juvenile male rats. *J Nutr Biochem.* 2011

Figure legends:

Figure 1: Increase in body weight and food intake during life in NF and OF mice.

A: increase in body weight. *, $P < 0.05$ was considered significant (one-way ANOVA).

B: percentage of body weight increase in OF mice as compared to that in NF mice.

C: body composition (fat mass, lean mass and total water) in percentage of body weight of NF and OF mice. *, $P < 0.05$ was considered as significant difference between NF and OF mice body composition.

Data are expressed as means \pm SEM from 10 animals per group

Figure 2: Oxidative stress indexes in plasma and heart tissue of 7-months old NF or OF mice.

A: plasma hydroperoxides. B: CP nitroxide radical formation in heart tissue. C: representative anisotropic signal of CP radical in heart tissue at 100K. D: cardiac SOD activity. E: cardiac catalase activity. Data are expressed as means \pm SEM from 10 animals per group. P was calculated by Student's *t*-test.

Figure 3: Diastolic (DBP), systolic (SBP) and mean arterial blood pressure (MABP) measured by tail cuff method in anesthetized 7-months old NF or OF mice.

Figure 4: Echocardiographic measurements in NF or OF mice. A: Representative M-mode echocardiographic recordings are shown from 7-months old NF and OF mice. B: left ventricular end diastolic diameter (LVEDD) and left ventricular end systolic diameter (LVESD) of both group. C: left ventricular ejection fraction in %. Data are expressed as means \pm SEM from 10 animals per group. P was calculated by Student's *t*-test

Figure 5: Myocardial contractility recovery and tissue injury of hearts from 7-months old NF or OF mice, after 30 min of global normothermic ischemia followed by 2 hours of reperfusion.

A: recovery of pre-ischemic coronary flow (in %), B: recovery of pre-ischemic developed pressure (in %).

C: ratios of infarcted areas/non-ischemic tissue, in percentage (%). P was calculated by Student's *t*-test. D: representative pictures of TTC-staining of myocardial slices after ischemia-reperfusion. Red-stained areas stand for non-ischemic tissue and white areas represent infarcted tissue.

Figure 6: Ventricular remodeling of hearts from 7-months old NF or OF mice: A: representative picrosirius collagen staining of ventricular tissue. B: collagen density (% of area), C: MMP-2 mRNA expression (quantitative RT-PCR) and D: activity (gelatin zymography). P was calculated by Student's *t*-test.

Table 1:

Metabolic parameters of NF and OF mice groups. Fasting blood glucose was assayed by glucometry; cholesterol and triglycerides were assayed using colorimetric methods and plasma insulin, leptin and adiponectin were estimated using ELISA. P was calculated by Student's *t*-test.

	NF	OF
Fasting glucose (mmol/l)	10.27 ± 0.61	10.36 ± 0.59
Cholesterol (g/l)	0.68 ± 0.03	0.78 ± 0.02 *
Insulin (ng/ml)	0.99 ± 0.08	1.64 ± 0.19 *
Leptin (ng/dl)	0.39 ± 0.02	0.91 ± 0.16 *
Adiponectin	16.56 ± 2.35	9.02 ± 0.92
Apelin (pg/ml)	3.31 ± 0.03	3.32 ± 0.04

*, *P* < 0.05, NF vs. OF group.

Table 2:

List of genes differentially expressed between NF and OF mice at 24-days of age. Bold genes are genes extracted from the 102 genes list and the others are issued from the 822 genes list.

Gene	Description	FD	p
<u>Genes of structure</u>			
Ctnna3	catenin (cadherin associated protein), alpha 3	0,70	0,013
Dmd	dystrophin, muscular dystrophy	0,66	0,022
Mylk3	myosin light chain kinase 3	0,65	0,023
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	2,03	0,012
Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1	1,50	0,024
Col15a1	collagen, type XV, alpha 1	1,44	0,019
Col20a1	collagen, type XX, alpha 1	1,50	0,022
Col5a1	collagen, type V, alpha 1	1,53	0,018
Col6a1	collagen, type VI, alpha 1	1,41	0,024
Emilin1	elastin microfibril interfacier 1	1,37	0,024
Myl1	myosin, light polypeptide 1	1,89	0,017
Actn1	actinin, alpha 1	1,29	0,040
Col16a1	collagen, type XVI, alpha 1	1,35	0,048
Col1a1	collagen, type I, alpha 1	1,50	0,036
Col3a1	collagen, type III, alpha 1	1,67	0,033
Col4a4	collagen, type IV, alpha 4	1,38	0,034
Col6a2	collagen, type VI, alpha 2	1,36	0,045
Col6a3	collagen, type VI, alpha 3	1,40	0,036
Dync2li1	dynein cytoplasmic 2 light intermediate chain 1	1,36	0,045
Fbln7	fibulin 7	1,43	0,027
Sept9	septin 9	1,35	0,035
Tbcc	tubulin-specific chaperone C	1,23	0,045
Vim	vimentin	1,34	0,040
Xirp2	xin actin-binding repeat containing 2	1,31	0,046
<u>Other genes</u>			
Ednrb	endothelin receptor type B	0,63	0,012
Edn1	endothelin 1	1,39	0,019
Aplnr	apelin receptor	1,80	0,012
Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1	1,50	0,013
Igf1	insulin-like growth factor 1	1,39	0,024
Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	1,48	0,017

Figure 1

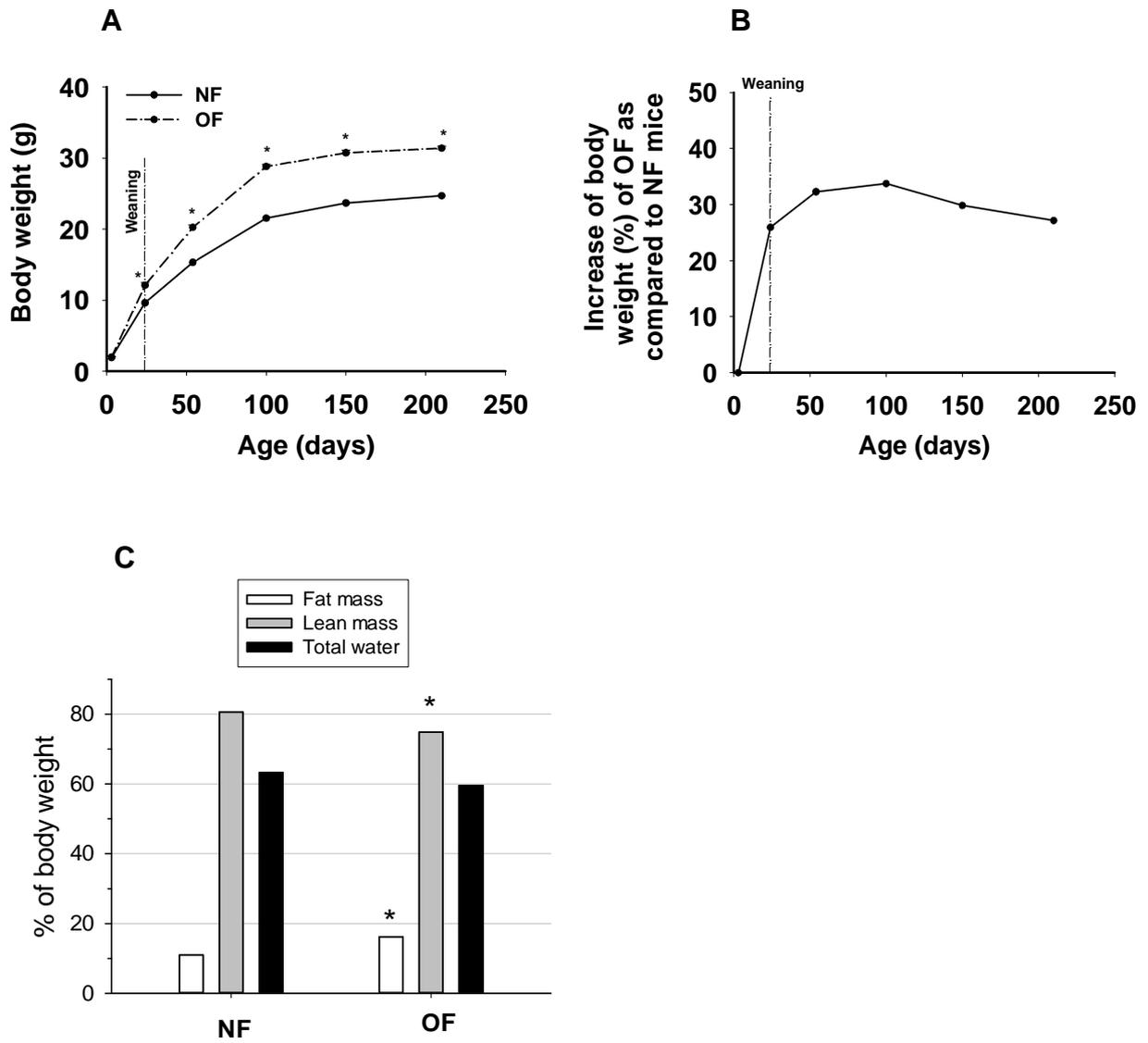


Figure 2

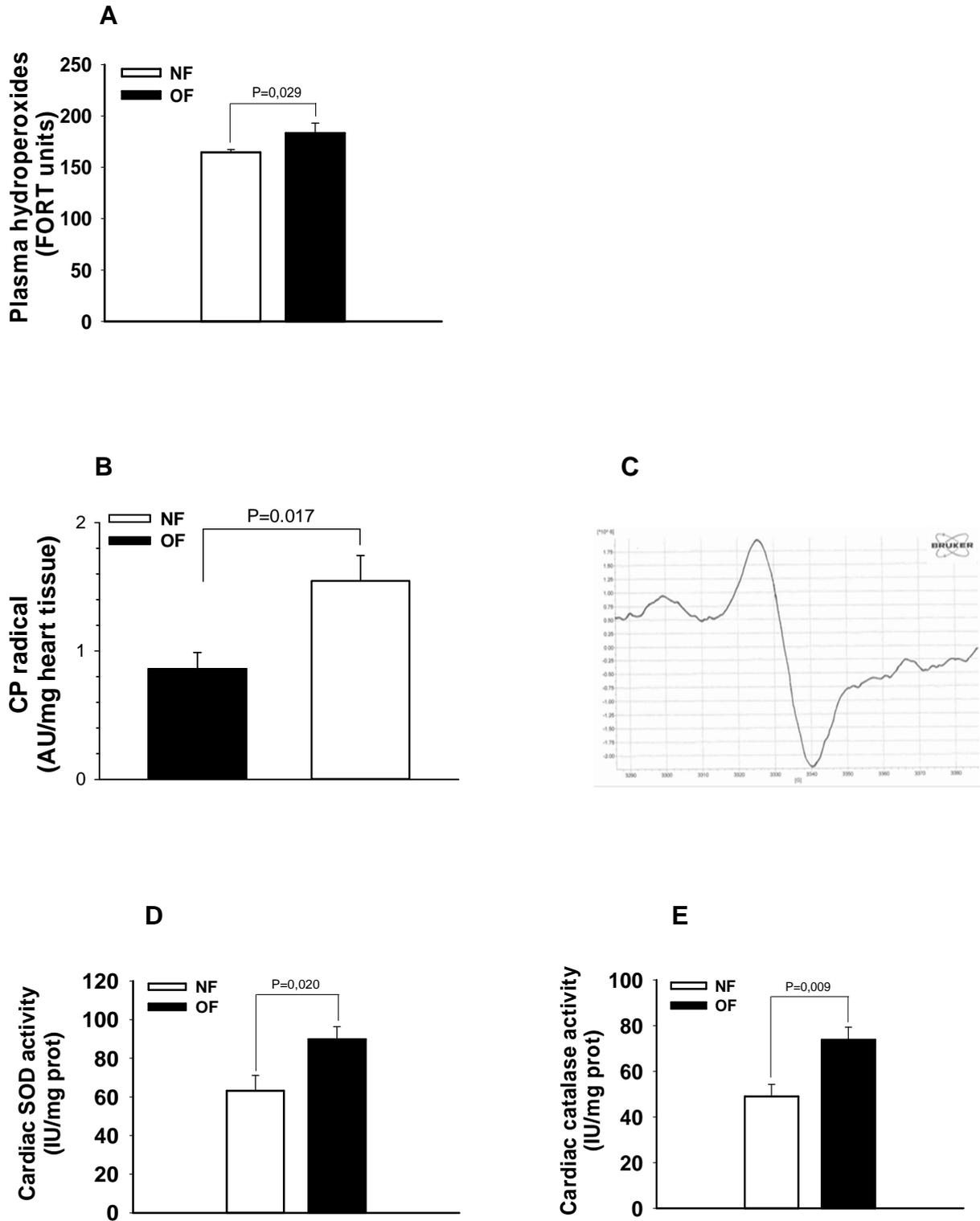


Figure 3

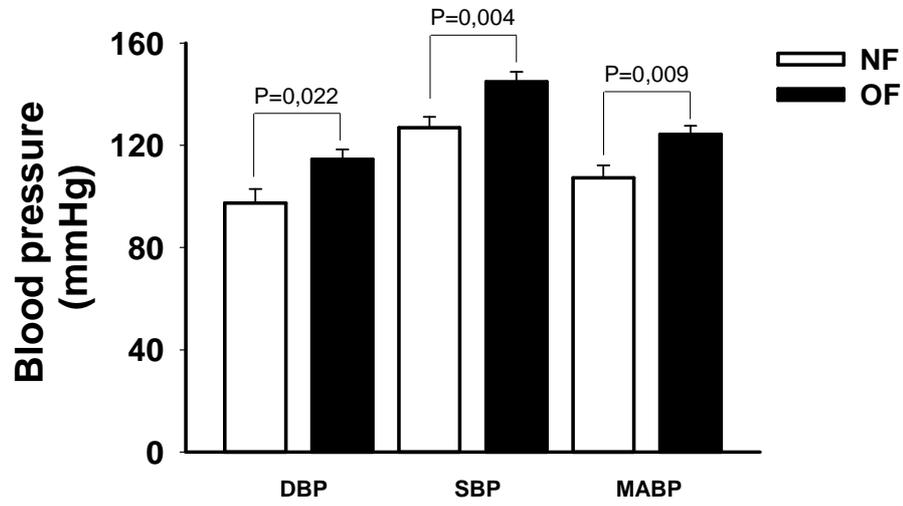


Figure 5

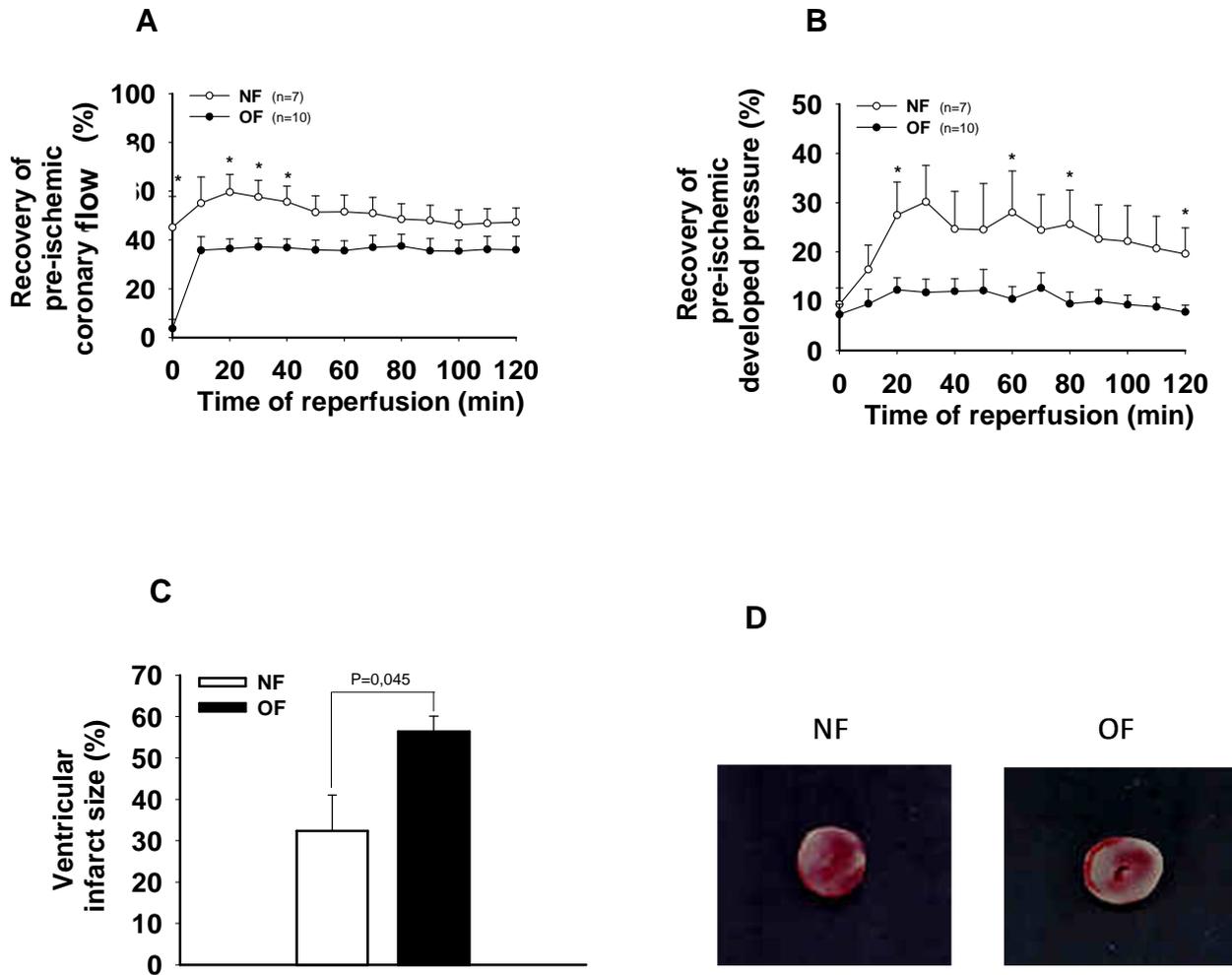
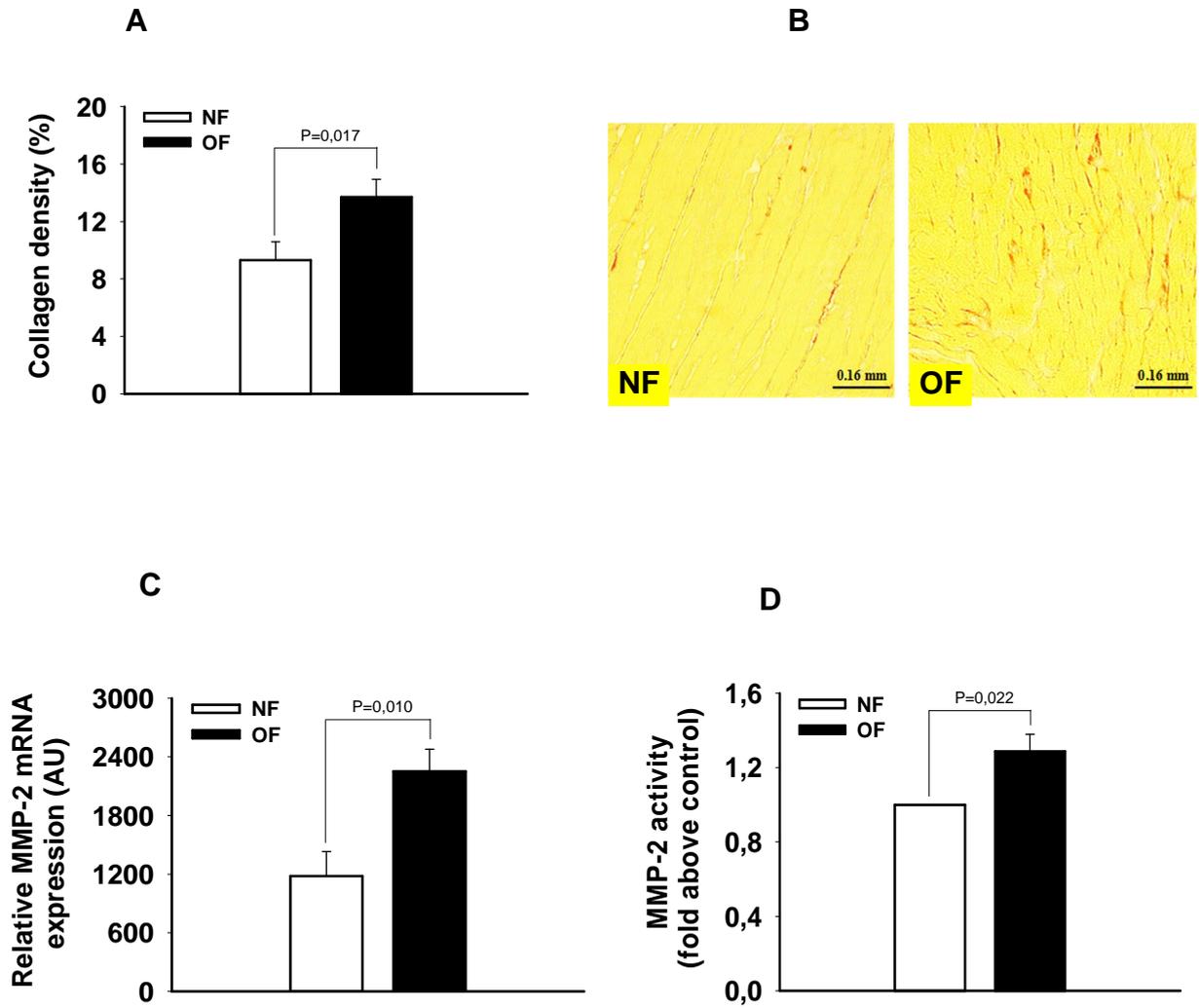


Figure 6



Data supplement Table 1

List of the 102 genes differentially expressed between NF and OF mice at 24-days of age.

Gene	Description	FD	p
<u><i>Cell division</i></u>			
Ivns1abp	influenza virus NS1A binding protein	0,42	0,005
Ext1	Exostosin	0,63	0,017
Rmnd5a	required for meiotic nuclear division 5 homolog A	0,70	0,013
Dap	death-associated protein	1,41	0,018
Mcm5	minichromosome maintenance deficient 5	1,47	0,021
Mcm2	minichromosome maintenance deficient 2 mitotin	1,50	0,017
Casp8	caspase 8	1,51	0,017
Plk2	polo-like kinase 2	1,55	0,018
Ngfr	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	1,64	0,018
<u><i>Cell signaling/communication</i></u>			
Slc5a3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3	0,61	0,013
Ednrb	endothelin receptor type B	0,63	0,012
Cngb3	cyclic nucleotide gated channel beta 3	0,63	0,006
Rragd	Ras-related GTP binding D	0,65	0,018
Camk1g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase I gamma	0,68	0,024
Art3	ADP-ribosyltransferase 3	0,69	0,018
Rrad	Ras-related associated with diabetes	0,69	0,014
Ctnna3	catenin (cadherin associated protein), alpha 3	0,70	0,013
Rilpl1	Rab interacting lysosomal protein-like 1	0,71	0,022
Plcd3	phospholipase C, delta 3	0,71	0,013
Ap2m1	adaptor protein complex AP-2	0,72	0,025
Lmo7	LIM domain only 7	0,73	0,019
Gab3	growth factor receptor bound protein 2-associated protein 3	1,34	0,023
Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	1,38	0,020
Edn1	endothelin 1	1,39	0,019
Igf1	insulin-like growth factor 1	1,39	0,024
Efemp2	epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	1,39	0,022
Megf6	multiple EGF-like-domains 6	1,39	0,013
Tmem106c	transmembrane protein 106C	1,40	0,017
Rcn3	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	1,44	0,018
Cacna1a	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	1,44	0,015
Figf	c-fos induced growth factor	1,45	0,018
Astn1	astrotactin 1	1,46	0,024
Arrdc4	arrestin domain containing 4	1,47	0,017
Olfml3	olfactomedin-like 3	1,49	0,016
Arl5c	ADP-ribosylation factor-like 5C	1,49	0,020
Slc16a11	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 11	1,51	0,013
Lrrc17	leucine rich repeat containing 17	1,55	0,017
Tmem178	transmembrane protein 178	1,56	0,024
Lpar4	lysophosphatidic acid receptor 4	1,61	0,024

Mdk	midkine	1,68	0,022
Aplnr	apelin receptor	1,80	0,012
Scn4b	sodium channel, type IV, beta	4,44	0,005

Cell structure/motility

Mylk3	myosin light chain kinase 3	0,65	0,023
Dmd	dystrophin, muscular dystrophy	0,66	0,022
Emilin1	elastin microfibril interfacier 1	1,37	0,024
Cplx2	complexin 2	1,38	0,022
Col6a1	collagen, type VI, alpha 1	1,41	0,024
Col15a1	collagen, type XV, alpha 1	1,44	0,019
S100a11	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	1,48	0,018
Col20a1	collagen, type XX, alpha 1	1,50	0,022
Col14a1	collagen, type XIV, alpha 1	1,50	0,024
Col5a1	collagen, type V, alpha 1	1,53	0,018
Myl1	myosin, light polypeptide 1	1,89	0,017
Acta1	actin, alpha 1, skeletal muscle	2,03	0,012

Cell/organism defense

N4bp2	NEDD4 binding protein 2 hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus)	0,61	0,020
Herc1	domain and RCC1 (CHC1)-like domain	0,62	0,017
Lrrc8a	leucine rich repeat containing 8A	0,66	0,024
Hmga1	high mobility group AT-hook 1	0,74	0,018
Gsta1	glutathione S-transferase, alpha 1	1,50	0,013
Thy1	thymus cell antigen 1, theta	1,53	0,024
Ces2e	carboxylesterase 2E	1,62	0,012
Cstad	CSA-conditional, T cell activation-dependent protein	2,28	0,005

Gene/protein expression

LOC790956	5.8S ribosomal RNA	0,27	0,023
Elk4	ELK4, member of ETS oncogene family	0,69	0,023
Zbtb7a	zinc finger and BTB domain containing 7a	0,71	0,017
Tfdp2	transcription factor Dp 2	0,75	0,020
Hhex	hematopoietically expressed homeobox	1,37	0,023
Zfp608	zinc finger protein 608	1,38	0,023
Tcf3	transcription factor 3	1,38	0,015
Zfp423	zinc finger protein 423	1,39	0,021
Wdr6	WD repeat domain 6	1,40	0,024
Eme2	essential meiotic endonuclease 1 homolog 2	1,44	0,024
Rab37	RAB37, member of RAS oncogene family	1,47	0,018
Nrip2	nuclear receptor interacting protein 2	1,48	0,018
Capn3	calpain 3	1,50	0,023
Tnfaip8l1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1	1,53	0,020
Wdr86	WD repeat domain 86	1,57	0,010
Adamts17	disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1	1,70	0,022

Metabolism

Atp6ap1l	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 1-like	0,38	0,005
----------	---	-------------	-------

Gls	glutaminase (Gls), nuclear gene encoding mitochondrial protein	0,62	0,009
Csnk2a1	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	0,72	0,022
Nme3	non-metastatic cells 3, protein expressed in	1,33	0,022
Anxa1	annexin A1	1,37	0,024
Mboat1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	1,44	0,018
Begain	brain-enriched guanylate kinase-associated	1,45	0,018
Gng10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	1,47	0,018
Gatm	glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase)	1,52	0,012
Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14	1,56	0,013
Bdh1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1	1,68	0,020

Unclassified

Scgb1c1	secretoglobin, family 1C, member 1	0,60	0,005
Heatr5b	HEAT repeat containing 5B	0,62	0,014
X05545	mRNA fragment for gag related peptide	0,63	0,017
Homer1	homer homolog 1	0,64	0,012
Tbx20	T-box 20	0,69	0,020
Fam160a1	family with sequence similarity 160, member A1	0,70	0,024
Ythdf3	YTH domain family 3	0,70	0,014
Fignl1	fidgetin-like 1	1,38	0,018
Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4	1,48	0,017
Pqlc3	PQ loop repeat containing 3	1,57	0,018
Morn4	MORN repeat containing 4	1,62	0,005
Fam81a	family with sequence similarity 81, member A	1,66	0,005
Crocc	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin	1,69	0,012

PARTIE III. DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Comme nous l'avons précédemment développé, l'incidence du syndrome métabolique est l'une des conséquences de l'épidémie mondiale de surpoids et d'obésité. Or, il est communément établi que l'environnement nutritionnel, notamment lors des premières étapes de la vie, participe grandement au développement du surpoids et de l'obésité. Ainsi, plusieurs études ont démontré que des perturbations nutritionnelles durant la période postnatale chez le rongeur entraînait l'installation d'un surpoids précoce, qui se maintient durant toute la vie de l'animal (Kappeler et al. 2009; Plagemann et al. 1999) et qui est associé à plusieurs facteurs reliés au syndrome métabolique (Boullu-Ciocca et al. 2005).

Notre travail de Doctorat s'est initialement inscrit dans la continuité de ces travaux, en explorant les effets de cette suralimentation postnatale sur différents paramètres notamment cardiovasculaires, métaboliques et du stress nitro-oxydant. Le résultat principal qui ressort de notre étude est que la suralimentation postnatale chez le rat ou la souris, indépendamment du régime alimentaire utilisé, notamment de régime gras, induit des anomalies cardio-métaboliques, associées à l'augmentation du niveau du stress oxydant ; ces événements s'accompagnent d'une sensibilité accrue du myocarde aux lésions d'ischémie-reperfusion.

Notre **première étude** confirme les résultats des travaux antérieurs, en effet nous avons montré que la suralimentation en période postnatale induisait une **augmentation d'environ 50 % du poids corporel chez le rat au moment du sevrage**, qui diminuait par la suite et tendait à se maintenir **(+ 10 %) jusqu'à l'âge adulte** (7 mois). Par ailleurs, outre la prise de poids, les rats suralimentés présentaient après leur sevrage **une augmentation de leur consommation de nourriture**. Chez la souris C57Bl/6, la **prise de poids initiale était plus modeste (30%) mais se maintenait à ce même niveau lors de la maturité**. Un des résultats intéressants obtenu grâce à la technique d'Echo-MRI est que le surpoids passait principalement par une **augmentation de la masse grasse** accompagnée d'une **diminution de la masse maigre**. Cependant, bien que les souris suralimentées présentent un poids corporel supérieur à celui des souris normo-alimentées, **les niveaux de consommation de nourriture entre les deux groupes n'étaient pas modifiés de manière significative** (données non présentées), ce qui avait déjà été constaté parfois chez le rat (Hou et al. 2011). On peut émettre l'hypothèse que l'augmentation de la masse grasse chez les souris ayant subi une suralimentation postnatale résulte d'une plus grande capacité de stockage de lipides associée à une baisse des dépenses énergétiques.

Au niveau des **paramètres biochimiques**, les rats suralimentés présentaient une élévation des taux plasmatiques de glucose à jeun, mais aussi d'insuline. Chez la souris en revanche, si l'insulinémie était augmentée significativement, la glycémie à jeun n'était pas modifiée, un résultat déjà observé par Kappeler *et al* en 2009. Ces **anomalies de l'équilibre glycémique** sont classiquement rencontrées chez les rongeurs ayant subi une suralimentation postnatale, et se caractérisent par un déséquilibre de la balance glucose/insuline, que l'on peut plus précisément apprécier lors d'épreuves hyperglycémiques (Test de Tolérance au Glucose par voie IntraPéritonéale, IPGTT ou Orale, OGTT) où les souris en surpoids augmentent plus rapidement leur glycémie et reviennent plus lentement aux valeurs initiales (Balonan and Sheng 2000; Boullu-Ciocca *et al.* 2005; Boullu-Ciocca *et al.* 2008; Cunha *et al.* 2009; Hou *et al.* 2011; Kappeler *et al.* 2009).

Cependant, chez le rat, contrairement à ce que l'on pouvait attendre au vu des résultats de la littérature, les valeurs plasmatiques du **cholestérol et des triglycérides** ne variaient pas de manière significative entre les deux groupes. Certaines études avaient montré à l'inverse, non seulement une augmentation des triglycérides et du cholestérol au sevrage (Moreira *et al.* 2009), et à l'âge adulte (Boullu-Ciocca *et al.* 2005) mais également une augmentation des acides gras libres circulants (AGL) (Boullu-Ciocca *et al.* 2008). Chez la souris en revanche, les taux de cholestérol plasmatiques étaient augmentés, ce qui vient confirmer les résultats d'une précédente étude menée par Kappeler *et coll.* en 2009 (Kappeler *et al.* 2009).

On sait aujourd'hui que le rôle du tissu adipeux, en plus de stocker les triglycérides, constitue un réservoir de cholestérol libre et non-estérifié (Krause and Hartman 1984). Ce pool de cholestérol adipocytaire provient principalement des lipoprotéines circulantes, dans la mesure où l'activité synthétique *de novo* de cholestérol par le tissu adipeux est limitée. Il a été décrit dans la littérature que le déséquilibre du métabolisme du cholestérol pourrait correspondre à un mécanisme de dysfonction des adipocytes au cours de l'obésité pouvant participer à la baisse de la réponse hormonale. La réduction de sensibilité à l'insuline est l'une des caractéristiques des adipocytes de grande taille chez les sujets ou animaux obèses (Lundgren *et al.* 2007; Molina *et al.* 1989). Les mécanismes mis en jeu dans cette résistance restent à préciser. Des données montrent toutefois que ces adipocytes présentent une diminution des taux membranaires de cholestérol qui pourrait être associée à une baisse de la réponse à l'insuline (Le Lay *et al.* 2001). Il faut également signaler ici que les régulations des paramètres biochimiques circulants sont susceptibles de présenter des variations, non seulement en fonction de l'espèce, mais aussi de la souche ou de l'âge de l'animal. Ainsi le lapin apparaît « prédisposé » à développer de l'athérosclérose (de Barros *et al.* 2009) alors que le rat ou la souris semblent « protégés » vis-à-vis du développement de cette pathologie.

De nombreux travaux de recherche ont mis en lumière le rôle des **adipocytes** dans la synthèse et la sécrétion d'une multitude de molécules bioactives : les **adipocytokines**. Ces adipocytokines, dont la représentante la plus connue est la leptine, interviennent aussi bien dans la régulation de la prise alimentaire que dans les processus inflammatoires et de régulation de différentes fonctions en particulier cardiovasculaires. Ces composés, agissant sur plusieurs systèmes biologiques, font du tissu adipeux une véritable glande endocrine. Les adipocytokines fournissent en outre un lien potentiel entre l'adipogenèse et ses conséquences sur la survenue de pathologies, et dans le cas qui nous intéresse précisément ici, dans le cadre des maladies cardiométaboliques. L'augmentation de la masse grasse déclenche également un état inflammatoire systémique et le déséquilibre entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est responsable en partie de l'élévation du niveau du stress oxydant. Dans le cadre de notre travail de Thèse, nous avons mesuré les taux plasmatiques de certaines adipocytokines : la leptine et l'adiponectine, et confirmé que **la suralimentation postnatale était bien accompagnée chez le rongeur, rat ou souris, d'une augmentation systématique de la leptine**. Conformément aux résultats issus de la littérature, l'hyperleptinémie observée chez les souris suralimentées est corrélée à l'augmentation de la masse grasse. L'hyperleptinémie, qui peut être reliée à une production majorée de leptine par les adipocytes est aussi associée à un phénomène de « leptinorésistance ». Cette résistance pourrait résulter soit d'un défaut de transport de leptine à travers la barrière hémato-encéphalique soit d'une altération de la cascade de signalisation conduisant à sa mauvaise régulation par le système nerveux central (Munzberg 2008). En outre, une altération fonctionnelle du récepteur ObRb au niveau central pourrait aussi être à l'origine de cette résistance. Par ailleurs, l'augmentation des glucocorticoïdes observée chez les rats suralimentés (Boullu-Ciocca et al. 2005) peut stimuler la sécrétion de leptine au niveau du tissu adipeux (Slieker et al. 1996). L'hyperleptinémie est largement retrouvée chez les sujets atteints de diabète de type II. L'insulinorésistance précède le plus souvent le diabète de type II, qui se développe plus fréquemment chez les sujets en surpoids et obèses. (Field et al. 2001; Mokdad et al. 2000). Ainsi, l'hyperleptinémie est associée à une hyperinsulinémie caractéristique de l'insulinorésistance. (Ren 2004).

Pour l'**adiponectine**, les résultats sont plus contrastés, en effet nous n'avons constaté son augmentation que chez le rat, un résultat d'ailleurs assez paradoxal par rapport aux données de la littérature. L'adiponectine, est une adipocytokine produite principalement par les adipocytes (Pineiro et al. 2005) et circulant dans le sang en concentration élevée. Elle possède des propriétés anti-inflammatoires, athéroprotectives et insulino-sensibilisantes. Sa concentration plasmatique est diminuée chez les patients et dans des modèles animaux d'obésité (Arita et al. 1999), de diabète de type 2 (Hotta et al. 2000) et qui présentent des

atteintes cardiovasculaires (Kumada et al. 2003). Il a été également montré que les personnes atteintes d'obésité, présentant des faibles taux plasmatiques d'adiponectine ont une augmentation du niveau du stress oxydant circulant (Furukawa et al. 2004).

Nos résultats montrent que, concomitamment aux perturbations des paramètres métaboliques, **il existe une élévation du niveau de stress oxydant**. En effet, les rats suralimentés présentaient une **baisse des taux circulants de vitamine C**, ce qui pourrait s'expliquer par une plus grande utilisation de cette vitamine afin de faire face à **l'augmentation des taux circulants d'hydroperoxydes**. Plusieurs études ont rapporté une corrélation inverse entre la concentration de vitamine C et le degré d'obésité (Kant 2003; Moor de Burgos et al. 1992). Les hydroperoxydes, quant à eux, sont des substances provenant de l'oxydation de composés circulants par le peroxyde d'hydrogène, soit de manière spontanée, soit induite par des peroxydases. On retrouve des taux circulants augmentés à la fois chez le rat et la souris en surpoids. Des travaux conduits au sein de notre Laboratoire sur les patients au cours de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde ont pu montrer que ces taux de peroxydes étaient un reflet pertinent du niveau du stress oxydant circulant (Lorgis et al. 2010). De nombreux travaux ont précisé l'implication du stress oxydant dans l'initiation et le développement des maladies cardiovasculaires telles l'hypertension artérielle et l'athérosclérose (Dobrian et al. 2001; Furukawa et al. 2004). Il est toutefois important de préciser que la part circulante des indices du stress oxydant ne suffit pas à elle seule à expliquer les liens existant entre les caractéristiques de la pathologie et le rôle du stress oxydant. C'est pourquoi dans notre étude, nous avons évalué le niveau du **stress nitro-oxydant tissulaire cardiaque** par deux approches : 1) directement par spectroscopie de Résonance Paramagnétique Electronique, 2) en évaluant l'activité de certaines enzymes antioxydantes. Chez la souris C57Bl/6, l'utilisation de la sonde radicalaire CMH, perméable aux membranes cellulaires, et qui s'oxyde, en présence d'anion superoxyde ou de peroxyde, en un radical nitroxyde CP* stable permet d'appréhender la mesure du niveau redox intracellulaire (Dikalov et al. 1997b; Dikalov et al. 1997c; Dikalov et al. 1997a). Nos résultats originaux précisent que le niveau d'oxydation lié à la présence d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote au niveau du tissu cardiaque est très nettement augmenté chez la souris C57Bl/6 ayant subi une suralimentation postnatale. Ce résultat original est en faveur d'un **accroissement du niveau du stress nitro-oxydant tissulaire cardiaque**. Il a été démontré que la formation des ERO est amplifiée au cours de l'obésité.

Les NADPH oxydases sont des sources de production d'anion superoxyde dans le cœur. Ces enzymes, essentielles au niveau du système cardiovasculaire, voient leur niveau d'expression ou d'activité accrus dans différentes situations rencontrées chez l'homme ou chez l'animal, telles que l'athérosclérose, le diabète ou l'hypertension artérielle (HTA)

(Landmesser et al. 2003; Rajagopalan et al. 1996). L'anion superoxyde produit par ces enzymes est capable à son tour d'interagir avec d'autres molécules pour former une large famille d'ERO. Dans notre modèle de suralimentation postnatale, nous avons alors émis l'hypothèse qu'un accroissement de l'activité des NADPH oxydases soit à l'origine de l'augmentation du stress oxydant. Malheureusement, nous n'avons constaté aucune différence d'activité des NOX, tant au niveau vasculaire que cardiaque chez le rat adulte (résultats non présentés dans la Thèse). Rappelons que les NOX ne sont pas les seules enzymes impliquées dans la production de ROS, toutes les oxydases participent à cette production et des organites tels que la mitochondrie ou le réticulum sarcoplasmique sont le siège de formations importantes d'anions superoxydes. Dès lors, il est tentant de penser que les perturbations induites par la suralimentation postnatale pourraient passer par un déséquilibre de la fonction d'organites intracellulaires tels que les mitochondries, particulièrement abondantes au niveau du cardiomyocyte.

D'une manière qui pourrait, au premier abord, sembler paradoxale, nous avons en revanche constaté au sein du tissu cardiaque une **augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutases (SOD), et des catalases**. Il est tout à fait probable qu'il s'agisse alors d'un mécanisme **d'adaptation cellulaire** consécutif à une augmentation du stress oxydant myocardique. Ce mécanisme d'adaptation a été déjà démontré au sein de notre Laboratoire dans un modèle de déficience en vitamine C où le stress oxydant était accru (C. Vergely et al. 2004).

Il existe un lien entre l'obésité et le stress oxydant circulant (Keaney et al. 2003; Suzuki et al. 2003), mais également entre le surpoids et l'augmentation de molécules pro-oxydantes (Pou et al. 2007). Ce travail pourrait bien entendu être complété par une analyse des taux de glutathion, réduit et oxydé, ainsi que de l'activité des glutathion peroxydases. Ainsi, et pour résumer, **les données présentées dans notre travail de Thèse ont montré pour la première fois, que la suralimentation, en plus d'induire une augmentation de la masse grasse, augmentait le niveau de stress oxydant aussi bien circulant que tissulaire**. Ces données initiales pourront être complétées ultérieurement dans une étude plus approfondie des mécanismes impliqués dans ce déséquilibre redox.

D'autre part, au vu des perturbations métaboliques et oxydatives, nous avons considéré que la suralimentation postnatale pouvait induire des **altérations des paramètres cardiovasculaires**.

Dans cette continuité, nous nous sommes intéressés à la **vaso-réactivité aortique et coronaire ex vivo**, chez le rat adulte présentant un surpoids. Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de mettre en évidence une différence de réactivité vasculaire entre les deux groupes de rat, ni au niveau de la réactivité de l'aorte thoracique ni au niveau coronaire, que

ce soit en présence de bradykinine (vasodilatateur dépendant de l'endothélium) ou de nitroprussiate de sodium (indépendant de l'endothélium). Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux qui ne mettent pas en évidence une différence du niveau de l'activité des NADPH oxydases vasculaires.

En ce qui concerne l'étude des paramètres fonctionnels, chez la souris C57Bl/6 de 7 mois, anesthésiée, ayant subi une suralimentation postnatale, nous avons pu mettre en évidence une **augmentation des pressions artérielles diastoliques, systoliques et moyennes**. Ce résultat est espèce-dépendant, car nous avons obtenus des résultats différents chez le rat : aucune variation des pressions artérielles (données non publiées). Cette différence s'explique par des différences en termes d'espèce ; en effet, le choix du modèle murin semble plus judicieux quant à l'exacerbation d'éventuelles altérations cardiovasculaires. Du point de vue vasculaire, il est maintenant admis que le stress oxydant intervient dans la dysfonction endothéliale en facilitant la mise en jeu de facteurs vasoconstricteurs dont les actions se conjuguent pour conduire à une hypertension artérielle (Dobrian et al. 2001; Furukawa et al. 2004). L'anion superoxyde entre en contact avec le NO et génère du peroxyde d'azote. Ainsi, le facteur vasodilatateur (NO) est diminué. Par ailleurs, le peroxyde d'azote nouvellement formé peut également intervenir dans la régulation de l'activité de la NOS3. En effet, le peroxyde d'azote induit un découplage fonctionnel de l'enzyme via une oxydation de son cofacteur BH₄, qui aboutit à la génération d'anion superoxyde aux dépens du NO (Milstien and Katusic 1999). Il est bien admis que l'étiologie de l'HTA est multifactorielle. A côté des facteurs locaux libérés par l'endothélium, des systèmes de rétrocontrôles nerveux jouent un rôle majeur en particulier le système nerveux autonome (SNA). Des travaux ont dans ce cadre bien précisé la contribution du système nerveux sympathique, son activité étant augmentée chez les individus présentant une hypertension artérielle (Palatini 2001).

Parmi les systèmes de rétrocontrôle mis en jeu lors d'une élévation de la pression artérielle, l'importance du système rénine-angiotensine n'est plus à démontrer. Une étude récente indique que la suralimentation postnatale étant associée à une perturbation de ce système notamment au niveau rénal avec une altération du niveau d'expression des récepteurs de type 2 à l'angiotensine II (AT2) (Yim et al. 2011).

Le maintien chronique d'une pression artérielle élevée est à l'origine du développement d'un remodelage cardiaque, passant par une série de mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à une hypertrophie ventriculaire gauche adaptative. Dans notre étude, aucune hypertrophie adaptative n'a été observée. En effet, le ratio masse ventriculaire/ poids de l'animal des souris ayant subi la suralimentation postnatale n'était pas significativement différent des souris contrôles (données non présentées). Cette absence d'hypertrophie cardiaque peut s'expliquer par le fait que l'augmentation de la pression artérielle soit trop modeste, ou de trop courte durée pour induire une hypertrophie ventriculaire gauche mais

également par la mise en jeu potentielle de processus d'adaptation efficace. Il faut également noter que nos animaux ne sont pas soumis à des situations d'exercices imposés, qui dans certaines études visent à préciser les conditions d'apparitions et à démasquer la présence d'une insuffisance cardiaque : tapis roulant, nage, etc... Il aurait été intéressant dans ce cadre de pouvoir vérifier si ces animaux NA et SA présentaient le même niveau d'activité spontanée.

Une des forces majeures de notre **deuxième étude**, a été l'évaluation de la **fonction cardiaque *in vivo*** des souris suralimentées adultes, par échocardiographie du petit animal, apportant un éclairage nouveau sur l'impact du surpoids sur les paramètres cardiaques. En effet, **les cœurs des souris suralimentées présentaient une diminution à la fois de la fraction de raccourcissement et de la fraction d'éjection du ventricule gauche**. Cette baisse de la compliance cardiaque pourrait résulter d'une augmentation du dépôt de collagène observé chez ces mêmes souris (voir plus loin).

Les études expérimentales menées chez le rat précisent les relations entre la dysfonction cardiaque au cours de l'obésité et la baisse de l'activité des pompes calciques (Leopoldo et al. 2011), pour lesquelles des modifications oxydatives du transporteur actif de calcium SERCA2a (sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) ont été rapportées au cours de l'obésité (S. Y. Li et al. 2006). La baisse de l'activité contractile cardiaque peut être également associée à une lipotoxicité. En effet, il a été démontré chez les souris obèses, une plus grande accumulation de lipides dans les cardiomyocytes conduisant à une dysfonction diastolique (Buchanan et al. 2005; Christoffersen et al. 2003). Il apparaît que le métabolisme lipidique au sein du myocarde joue un rôle prépondérant dans le maintien de la fonction contractile. Les souris surexprimant la lipoprotéine lipase, principale enzyme permettant l'hydrolyse des TG des lipoprotéines plasmatiques, présentent une plus grande absorption lipidique cardiaque accompagnée d'une cardiomyopathie (Yagyu et al. 2003). De la même manière, l'augmentation de l'incorporation d'acides gras libres cardiaques suite à une surexpression de FATP1 (Fatty acids transport protein1) contribue à une augmentation du métabolisme des acides gras. Dans ce modèle, l'altération de l'homéostasie lipidique cardiomyocytaire conduit également à une dysfonction cardiaque et ce même en l'absence de perturbation métabolique systémique (Chiu et al. 2005).

Au cours de notre étude, grâce à la technique du **cœur isolé perfusé**, nous avons pu induire **ex vivo une séquence d'ischémie-reperfusion** et observer les éventuelles différences de récupération fonctionnelle cardiaque. Bien que les paramètres, notamment ceux de la pression ventriculaire diastolique et systolique ne soient pas statistiquement différents entre les deux groupes chez le rat Wistar, il est apparu qu'après une ischémie, les cœurs des rats

SA récupéraient moins bien leur débit cardiaque lors de la reperfusion. Cette baisse de la récupération du débit cardiaque était accompagnée d'une augmentation de la libération et de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH), qui est un marqueur de souffrance cellulaire. Ces résultats indiquent que **la suralimentation postnatale induit une plus grande susceptibilité du myocarde à une séquence d'ischémie-reperfusion.**

En accord avec les résultats obtenus précédemment chez le rat, la suralimentation postnatale chez la souris conduit à des modifications de la récupération des paramètres cardiaques après une séquence d'ischémie-reperfusion. Cependant, pour une durée d'ischémie identique (30 min), **les paramètres fonctionnels cardiaques semblent être plus affectés chez la souris que chez le rat.** En effet, on constate une **altération de la récupération de la pression systolique et diastolique du ventricule gauche** ainsi qu'une **diminution de la contractilité** et de la relaxation myocardique. Cette plus grande sensibilité à l'ischémie-reperfusion s'accompagne d'un **accroissement très net de la surface des zones nécrosées** observées chez ces mêmes animaux.

Cette altération de la récupération des paramètres cardiaques pourrait s'expliquer par une **réorganisation structurelle myocardique.** Cette hypothèse est en partie étayée par les travaux de Moreira et coll. et de Velkoska et coll (Moreira et al. 2009; Velkoska et al. 2008). Ces derniers ont montré qu'un état de suralimentation postnatale provoquait à la fois une hypertrophie ventriculaire gauche et une fibrose cardiaque, ce que corroborent nos résultats histologiques. En effet, nos travaux montrent, à la fois chez le rat et la souris adulte, que la suralimentation postnatale induit des modifications de l'architecture cardiaque, avec un dépôt plus important de fibres de collagènes chez les animaux en surpoids, marquant un état de remodelage fibreux du ventricule. La contribution des métalloprotéinases (MMP), principalement de la MMP-2 dans les phénomènes de remodelage cardiaque suite à une ischémie-reperfusion (Kandasamy et al. 2010) n'est plus à discuter. Nos résultats montrent clairement que la suralimentation postnatale **augmente à la fois l'expression et l'activité de cette métalloprotéinase** (Habbout et al. 2012).

Dans une approche visant à **expliquer les mécanismes précoces** impliqués dans la survenue de ces altérations cardiaques, nous avons effectué des analyses du **profil d'expression génique de cœurs de souris de 24 jours** (sevrage) ayant subi ou non une suralimentation postnatale. Ces résultats font apparaître que, dans une période très courte de temps, des modifications nutritionnelles sont capables d'infléchir l'expression d'un grand nombre de gènes (548) qui peuvent être sur ou sous exprimés, mais dont une proportion importante se rapporte à des protéines impliquées dans la **constitution du cytosquelette**

ou de la matrice extracellulaire. Ces résultats nouveaux constituent un argument supplémentaire pour émettre l'hypothèse que les processus de remodelage que l'on observe tardivement à 8 mois sont peut-être le reflet de changements initiaux dans une période critique où la morphogenèse cardiaque n'est que partiellement terminée. Il faut préciser toutefois que l'analyse à laquelle nous avons procédé ne permet pas de déterminer quel type cellulaire : cardiomyocyte, cellule musculaire lisse, cellule endothéliale, fibroblaste, est à l'origine des changements d'expression observés, et qu'une confirmation, à l'échelle cellulaire, nucléaire et protéique doit nécessairement étayer ces résultats préliminaires.

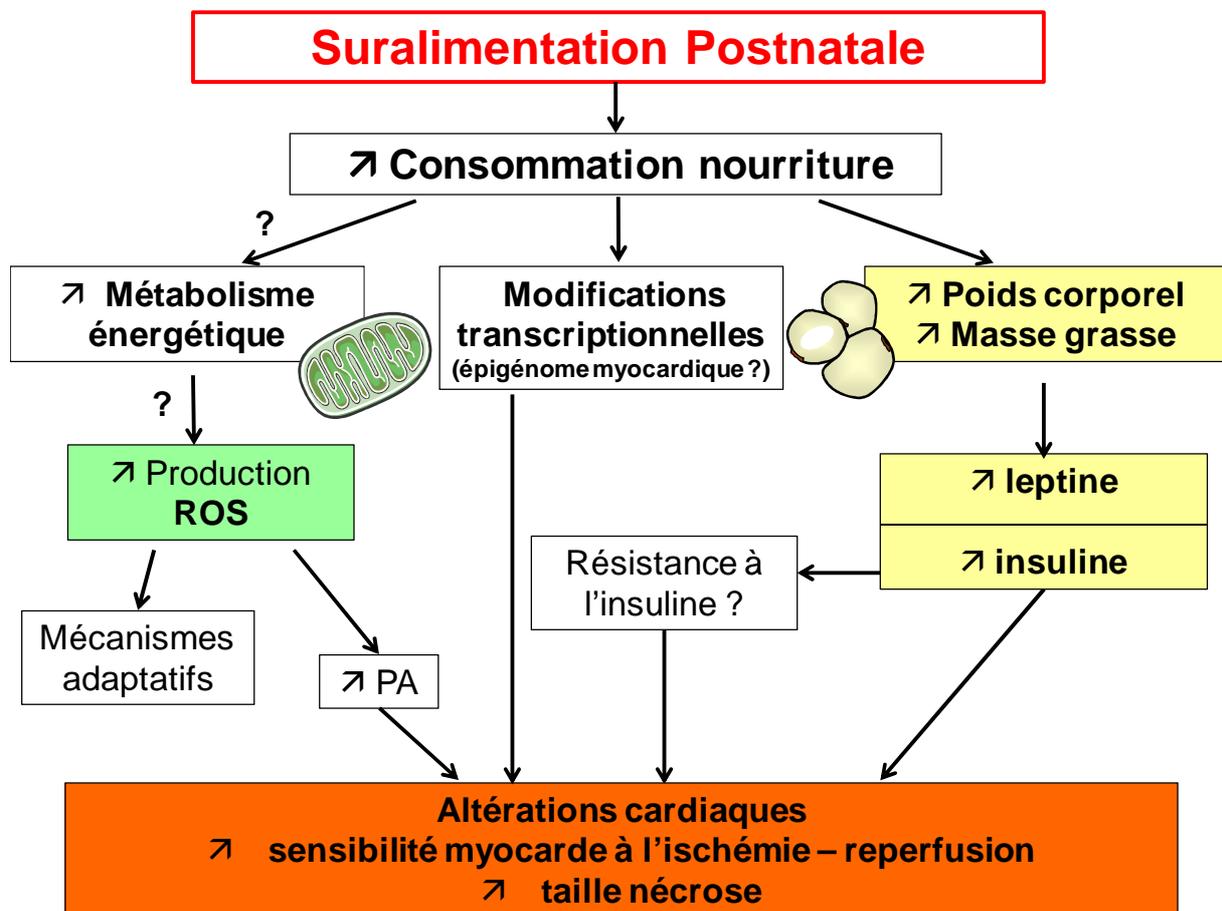


Figure 15 : Schéma représentant les effets de la suralimentation postnatale.

PARTIE IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En résumé, notre travail de Doctorat a ainsi pu montrer qu'une suralimentation postnatale, induite par une restriction de la taille des portées chez le rat Wistar et la souris C57Bl/6, conduisait à un surpoids d'ampleur modeste (jusqu'à 30%) mais définitif chez l'adulte, lié à une adiposité accrue et accompagné de perturbations nitro-oxydatives et cardio-métaboliques :

- Déséquilibre oxydatif au niveau du plasma sanguin
- Stress nitro-oxydant tissulaire cardiaque accru associé à des augmentations compensatoires d'activités antioxydantes
- Déséquilibre de la balance glucose/insuline
- Dyslipidémie
- Hyperinsulémie et hyperleptinémie
- Hypertension artérielle modérée
- Discrète dysfonction ventriculaire gauche
- Plus grande sensibilité du myocarde aux lésions d'ischémie-reperfusion, d'un point de vue de la fonction et de la taille de l'infarctus
- Remodelage fibreux du ventricule gauche

De manière très originale, nos travaux précisent par ailleurs que cette perturbation nutritionnelle précoce intervient dans une période critique du développement cardiaque. Cette période est caractérisée par des modifications des fonctions cellulaires, en effet, un certain nombre de gènes codant pour des protéines constitutives de l'architecture cardiaque, et des facteurs impliqués dans la signalisation cellulaire, voient leur expression modifiée très précocement. Les changements de l'environnement énergétique conduisent à des processus d'adaptations métaboliques.

Au regard de nos résultats actuels, il nous semble nécessaire de réfléchir sur l'interprétation de résultats d'études comparant des animaux issus de portées de taille non équivalente, comme c'est bien souvent le cas lors de travaux expérimentaux réalisés sur des animaux transgéniques dont on connaît les difficultés pour maintenir les souches. En effet, la souris C57Bl/6 est le fonds génétique d'un grand nombre de souris dont le patrimoine génétique a été modifié afin d'appréhender la participation effective d'une protéine dans la survenue d'une situation physiopathologique donnée. Or, certaines de ces souris présentent une diminution de leurs capacités reproductives, et leurs portées sont souvent de taille inférieure à celle des souris sauvages. Il apparaît donc essentiel de normaliser au mieux les conditions

nutritionnelles des souris lors de la période précédant le sevrage, afin de ne pas attribuer de manière erronée à l'inactivation d'un gène, des conséquences qui ne seraient dues qu'aux effets pérennes d'une suralimentation postnatale.

Ce travail doit toutefois être complété et poursuivi par des études où seront comparées, les expressions géniques au niveau des cœurs de souris matures (8 mois) ayant subi ou non une suralimentation postnatale. Ce projet visera alors à apprécier si les modifications initialement observées se sont installées de manière permanente, et à explorer les mécanismes épigénétiques qui sont associés à cette suralimentation.

S'il en était le cas, il serait alors intéressant d'évaluer les incidences de ces changements sur la génération suivante, issue des parents ayant subi une suralimentation postnatale, afin d'établir le caractère trans-générationnel des altérations nutritionnelles précoces.

Dans le cadre du développement de ce projet, nous souhaiterions évaluer si les conséquences tardives de ces modifications initiales sont associées à des variations d'activités de certaines enzymes telles que les sirtuines ou voies de transmission qui peuvent être approchées par voie pharmacologique ou nutritionnelle.

Un des objectifs au sein de notre Laboratoire est de pouvoir relier les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales aux situations rencontrées en clinique. Dans ce cadre, des études doivent être entreprises afin de préciser si les caractéristiques de l'alimentation postnatale constituent un facteur susceptible d'être impliqué dans la sensibilité de l'adulte au développement de pathologies cardiovasculaires. La « plasticité génique » semble établie mais les processus intimes qui régulent cette plasticité restent à préciser. Si nos travaux entrepris chez la souris permettent d'identifier une ou plusieurs protéines cibles de cette modulation d'expression génique au niveau cardiaque, induite par des changements nutritionnels précoces, nous souhaiterions évaluer son niveau d'expression et sa présence éventuelle chez des patients à risque cardiovasculaire élevé, au décours de l'infarctus du myocarde ou du pontage coronaire, afin d'en relier ses modifications à des indices biologiques et cliniques de récupération fonctionnelle cardiaque.

PARTIE V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-aleem, S., et al. (1998), 'Regulation of carbohydrate and fatty acid utilization by L-carnitine during cardiac development and hypoxia', *Mol Cell Biochem*, 180 (1-2), 95-103.
- Abe, Y., et al. (2007), 'Leptin induces elongation of cardiac myocytes and causes eccentric left ventricular dilatation with compensation', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292 (5), H2387-96.
- Aebi, H (1984), 'Catalase in vitro', *Methods in Enzymology*, 105, 121-26.
- Ahima, R. S. and Flier, J. S. (2000), 'Adipose tissue as an endocrine organ', *Trends Endocrinol Metab*, 11 (8), 327-32.
- Ajuwon, K. M. and Spurlock, M. E. (2005), 'Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288 (5), R1220-5.
- Akki, A., et al. (2009), 'NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function', *J Mol Cell Cardiol*, 47 (1), 15-22.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., and Knowles, R. G. (2001), 'Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition', *Biochem J*, 357 (Pt 3), 593-615.
- Arita, Y., et al. (1999), 'Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity', *Biochem Biophys Res Commun*, 257 (1), 79-83.
- Artur, Y., et al. (1994), '[Updating of relative data on tocopherols in clinical biochemistry]', *Ann Biol Clin (Paris)*, 52 (1), 9-31.
- Atance, J., Yost, M. J., and Carver, W. (2004), 'Influence of the extracellular matrix on the regulation of cardiac fibroblast behavior by mechanical stretch', *J Cell Physiol*, 200 (3), 377-86.
- Bado, A., et al. (1998), 'The stomach is a source of leptin', *Nature*, 394 (6695), 790-3.
- Ballard, F. B., et al. (1960), 'Myocardial metabolism of fatty acids', *J Clin Invest*, 39, 717-23.
- Balonan, L. C. and Sheng, H. P. (2000), 'Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats', *Pediatr Res*, 48 (5), 668-73.
- Barbee, R. W., Kline, J. A., and Watts, J. A. (2000), 'Depletion of lactate by dichloroacetate reduces cardiac efficiency after hemorrhagic shock', *Shock*, 14 (2), 208-14.
- Barker, D. J. (1990), 'The fetal and infant origins of adult disease', *BMJ*, 301 (6761), 1111.
- Barker, D. J. (1995), 'Fetal origins of coronary heart disease', *BMJ*, 311 (6998), 171-4.
- Barker, D. J. and Osmond, C. (1986), 'Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales', *Lancet*, 1 (8489), 1077-81.
- Barry-Lane, P. A., et al. (2001), 'p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice', *J Clin Invest*, 108 (10), 1513-22.
- Bartelds, B., et al. (1998), 'Perinatal changes in myocardial supply and flux of fatty acids, carbohydrates, and ketone bodies in lambs', *Am J Physiol*, 274 (6 Pt 2), H1962-9.
- Battelli, M. G. and Lorenzoni, E. (1982), 'Purification and properties of a new glutathione-dependent thiol:disulphide oxidoreductase from rat liver', *Biochem J*, 207 (1), 133-8.

- Bedard, K. and Krause, K. H. (2007), 'The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology', *Physiol Rev*, 87 (1), 245-313.
- Beltowski, J., et al. (2004), 'Up-regulation of renal Na⁺, K⁺-ATPase: the possible novel mechanism of leptin-induced hypertension', *Pol J Pharmacol*, 56 (2), 213-22.
- Berry, M. F., et al. (2004), 'Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts', *Circulation*, 110 (11 Suppl 1), II187-93.
- Binas, B., et al. (1999), 'Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization', *FASEB J*, 13 (8), 805-12.
- Bjorbaek, C., et al. (1998), 'Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels', *Endocrinology*, 139 (8), 3485-91.
- Boden, G. (2004), 'Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes', *J Investig Med*, 52 (6), 375-8.
- Bolli, R., et al. (1989), 'Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury', *Circ Res*, 65 (3), 607-22.
- Boubred, F., et al. (2007), 'Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats', *Am J Physiol Renal Physiol*, 293 (6), F1944-9.
- Boubred, F., et al. (2009), 'Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats', *Am J Physiol Renal Physiol*, 297 (4), F943-51.
- Bouchard, C. (1996), 'The causes of obesity: advances in molecular biology but stagnation on the genetic front', *Diabetologia*, 39 (12), 1532-3.
- Boullu-Ciocca, S., et al. (2008), '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*, 57 (3), 669-77.
- Boullu-Ciocca, S., et al. (2005), '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*, 54 (1), 197-203.
- Braunwald, E. and Kloner, R. A. (1982), 'The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction', *Circulation*, 66 (6), 1146-9.
- Bryant, N. J., Govers, R., and James, D. E. (2002), 'Regulated transport of the glucose transporter GLUT4', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (4), 267-77.
- Buchanan, J., et al. (2005), 'Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity', *Endocrinology*, 146 (12), 5341-9.
- Bujak, M. and Frangogiannis, N. G. (2007), 'The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling', *Cardiovasc Res*, 74 (2), 184-95.
- Burrell, J. H., et al. (2003), 'Growth and maturation of cardiac myocytes in fetal sheep in the second half of gestation', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 274 (2), 952-61.
- Burstein, B., et al. (2008), 'Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences', *Circulation*, 117 (13), 1630-41.

- Carantoni, M., et al. (1998), 'Relationships between fasting plasma insulin, anthropometrics, and metabolic parameters in a very old healthy population. Associazione Medica Sabin', *Metabolism*, 47 (5), 535-40.
- Carr, D. B., et al. (2004), 'Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome', *Diabetes*, 53 (8), 2087-94.
- Castan-Laurell, I., et al. (2011), 'Apelin, diabetes, and obesity', *Endocrine*, 40 (1), 1-9.
- Ceriello, A. (1997), 'Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation', *Diabet Med*, 14 Suppl 3, S45-9.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979), 'Hydroperoxide metabolism in mammalian organs', *Physiol Rev*, 59 (3), 527-605.
- Chang, L., Chiang, S. H., and Saltiel, A. R. (2004), 'Insulin signaling and the regulation of glucose transport', *Mol Med*, 10 (7-12), 65-71.
- Chehab, F. F., et al. (1997), 'Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin', *Science*, 275 (5296), 88-90.
- Chen, Y., Lasaitiene, D., and Friberg, P. (2004), 'The renin-angiotensin system in kidney development', *Acta Physiol Scand*, 181 (4), 529-35.
- Chintalgattu, V., Nair, D. M., and Katwa, L. C. (2003), 'Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR', *J Mol Cell Cardiol*, 35 (3), 277-86.
- Chiu, H. C., et al. (2005), 'Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy', *Circ Res*, 96 (2), 225-33.
- Chong, K. S., et al. (2006), 'Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure', *Eur J Heart Fail*, 8 (4), 355-60.
- Christen, S., et al. (1997), 'gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (7), 3217-22.
- Christoffersen, C., et al. (2003), 'Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice', *Endocrinology*, 144 (8), 3483-90.
- Cipollone, F., et al. (2005), 'Association between 5-lipoxygenase expression and plaque instability in humans', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (8), 1665-70.
- Clancy, R. M., et al. (2007), 'Role of hypoxia and cAMP in the transdifferentiation of human fetal cardiac fibroblasts: implications for progression to scarring in autoimmune-associated congenital heart block', *Arthritis Rheum*, 56 (12), 4120-31.
- Clarke, M. A., Stefanidis, A., and Spencer, S. J. (2011), 'Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life', *J Neuroendocrinol*.
- Clubb, F. J., Jr., et al. (1986), 'Cardiomegaly due to myocyte hyperplasia in perinatal rats exposed to 200 ppm carbon monoxide', *J Mol Cell Cardiol*, 18 (5), 477-86.
- Coker, R. H., et al. (2009), 'The impact of exercise training compared to caloric restriction on hepatic and peripheral insulin resistance in obesity', *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (11), 4258-66.
- Combs, T. P., et al. (2004), 'A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity', *Endocrinology*, 145 (1), 367-83.
- Conrad, M., et al. (2004), 'Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function', *Mol Cell Biol*, 24 (21), 9414-23.

- Cortopassi, G. and Wang, E. (1995), 'Modelling the effects of age-related mtDNA mutation accumulation; complex I deficiency, superoxide and cell death', *Biochim Biophys Acta*, 1271 (1), 171-6.
- Coutinho, T., et al. (2011), 'Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: a systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data', *J Am Coll Cardiol*, 57 (19), 1877-86.
- Crompton, M. and Costi, A. (1988), '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*, 178 (2), 489-501.
- Cunha, A. C., et al. (2009), 'Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2', *J Nutr Biochem*, 20 (6), 435-42.
- Cyrus, T., et al. (1999), 'Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice', *J Clin Invest*, 103 (11), 1597-604.
- Cyrus, T., et al. (2001), 'Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice', *Circulation*, 103 (18), 2277-82.
- Dahl, T. B., et al. (2007), 'Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization', *Circulation*, 115 (8), 972-80.
- Dalloz, Florence, et al. (1999), 'Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat', *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (7/8), 785-800.
- Davidowa, H. and Plagemann, A. (2007), 'Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats', *Neuroreport*, 18 (5), 521-4.
- de Barros, J. P., et al. (2009), 'Apolipoprotein CI is a physiological regulator of cholesteryl ester transfer protein activity in human plasma but not in rabbit plasma', *J Lipid Res*, 50 (9), 1842-51.
- De Falco, M., et al. (2002), 'Apelin expression in normal human tissues', *In Vivo*, 16 (5), 333-6.
- de Simone, G., et al. (2002), 'Association of left ventricular hypertrophy with metabolic risk factors: the HyperGEN study', *J Hypertens*, 20 (2), 323-31.
- DeFronzo, R. A. (1988a), 'Obesity is associated with impaired insulin-mediated potassium uptake', *Metabolism*, 37 (2), 105-8.
- DeFronzo, R. A. (1988b), 'Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM', *Diabetes*, 37 (6), 667-87.
- Delemasure, S., et al. (2007), 'Acute administration of epirubicin induces myocardial depression in isolated rat heart and production of radical species evaluated by electron spin resonance spectroscopy', *J Cardiovasc Pharmacol*, 50 (6), 647-53.
- Denke, M. A., Sempos, C. T., and Grundy, S. M. (1993), 'Excess body weight. An underrecognized contributor to high blood cholesterol levels in white American men', *Arch Intern Med*, 153 (9), 1093-103.
- De Peretti, C. and Castetbon, K. (2004), 'Etudes des résultats: surpoids et obésité chez les adolescents scolarisés en classe de troisième', *Direction de la recherche des études de l'évaluation et des statistiques (DRES)*, (283), 1-8.
- Detillieux, K. A., et al. (2003), 'Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium', *Cardiovasc Res*, 57 (1), 8-19.
- Di Angelantonio, E., et al. (2009), 'Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease', *JAMA*, 302 (18), 1993-2000.

- Di Bello, V., et al. (2006), 'Obesity cardiomyopathy: is it a reality? An ultrasonic tissue characterization study', *J Am Soc Echocardiogr*, 19 (8), 1063-71.
- Dikalov, S., Skatchkov, M., and Bassenge, E. (1997a), 'Spin trapping of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants', *Biochem Biophys Res Commun*, 231 (3), 701-4.
- Dikalov, S., Skatchkov, M., and Bassenge, E. (1997b), 'Quantification of peroxynitrite, superoxide, and peroxy radicals by a new spin trap hydroxylamine 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxo-piperidine', *Biochem Biophys Res Commun*, 230 (1), 54-7.
- Dikalov, S., et al. (1997c), 'Quantification of superoxide radicals and peroxynitrite in vascular cells using oxidation of sterically hindered hydroxylamines and electron spin resonance', *Nitric Oxide*, 1 (5), 423-31.
- Ding, G., et al. (2007), 'Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma', *J Mol Cell Cardiol*, 43 (1), 73-84.
- Dobrian, A. D., et al. (2001), 'Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension', *Hypertension*, 37 (2 Part 2), 554-60.
- Dorner, G., Hagen, N., and Witthuhn, W. (1976), '[Early postnatal overfeeding as an etiopathogenetic factor in adult obesity]', *Acta Biol Med Ger*, 35 (6), 799-803.
- Duzguncinar, O., et al. (2008), 'Plasma myeloperoxidase is related to the severity of coronary artery disease', *Acta Cardiol*, 63 (2), 147-52.
- Ecarnot-Laubriet, A., et al. (2003), 'The activation pattern of the antioxidant enzymes in the right ventricle of rat in response to pressure overload is of heart failure type.', *Heart Disease*, 5 (5), 308-12.
- Eguchi, M., et al. (2008), 'Leptin protects H9c2 rat cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis', *FEBS J*, 275 (12), 3136-44.
- Ellis, A. and Triggle, C. R. (2003), 'Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone', *Can J Physiol Pharmacol*, 81 (11), 1013-28.
- Ferraro, S., et al. (1996), 'Left ventricular systolic and diastolic function in severe obesity: a radionuclide study', *Cardiology*, 87 (4), 347-53.
- Field, A. E., et al. (2001), 'Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period', *Arch Intern Med*, 161 (13), 1581-6.
- Flegal, K. M., et al. (2010), 'Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008', *JAMA*, 303 (3), 235-41.
- Foretz, M., et al. (2006), '[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]', *Med Sci (Paris)*, 22 (4), 381-8.
- Frankel, D. S., et al. (2009), 'Resistin, adiponectin, and risk of heart failure the Framingham offspring study', *J Am Coll Cardiol*, 53 (9), 754-62.
- Fredersdorf, S., et al. (2004), 'Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats', *Cardiovasc Pathol*, 13 (1), 11-9.
- Fukuhara, A., et al. (2005), 'Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin', *Science*, 307 (5708), 426-30.
- Furukawa, S., et al. (2004), 'Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome', *J Clin Invest*, 114 (12), 1752-61.

- Galagudza, M., et al. (2004), 'Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm', *Eur J Cardiothorac Surg*, 25 (6), 1006-10.
- Galili, O., et al. (2007), 'Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292 (2), H904-11.
- Galinier, A., et al. (2006), 'Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats', *FEBS Lett*, 580 (27), 6391-8.
- Gao, W. D., et al. (1996), 'Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca²⁺-dependent proteolysis?', *Circ Res*, 78 (3), 455-65.
- Garcia, R. H., et al. (2002), 'DNA content and expression of cell cycle proteins in caterpillar nuclei from fetal human cardiac myocytes', *Virchows Arch*, 440 (1), 45-9.
- Garrison, R. J., et al. (1987), 'Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study', *Prev Med*, 16 (2), 235-51.
- Garvey, W. T., et al. (1998), 'Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance', *J Clin Invest*, 101 (11), 2377-86.
- Gates, P. E., et al. (2003), 'Adiposity contributes to differences in left ventricular structure and diastolic function with age in healthy men', *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (10), 4884-90.
- Ghosh, D. K. and Stuehr, D. J. (1995), 'Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction', *Biochemistry*, 34 (3), 801-7.
- Gladden, L. B. (2004), 'Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium', *J Physiol*, 558 (Pt 1), 5-30.
- Glasow, A. and Bornstein, S. R. (2000), 'Leptin and the adrenal gland', *Eur J Clin Invest*, 30 Suppl 3, 39-45.
- Goldstein, S. and Czapski, G. (1995), 'The reaction of NO. with O₂⁻ and HO₂.: a pulse radiolysis study', *Free Radic Biol Med*, 19 (4), 505-10.
- Goodwin, G. W., Taylor, C. S., and Taegtmeyer, H. (1998), 'Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work', *J Biol Chem*, 273 (45), 29530-9.
- Griffiths, E. J. and Halestrap, A. P. (1995), 'Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion', *Biochem J*, 307 (Pt 1), 93-8.
- Grove, K. L. and Smith, M. S. (2003), 'Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system', *Physiol Behav*, 79 (1), 47-63.
- Gualillo, O., Gonzalez-Juanatey, J. R., and Lago, F. (2007), 'The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives', *Trends Cardiovasc Med*, 17 (8), 275-83.
- Gustafson, B. (2010), 'Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis', *J Atheroscler Thromb*, 17 (4), 332-41.
- Guzik, T. J., et al. (2002), 'Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase', *Circulation*, 105 (14), 1656-62.
- Haass, M., et al. (2011), '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*, 4 (3), 324-31.
- Habbout, A., et al. (2012), 'Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood', *Biochimie*, 94 (1), 117-24.
- Hamilton, C. A., et al. (2004), 'Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease', *Clin Sci (Lond)*, 106 (3), 219-34.
- Harrison, R. (2002), 'Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?', *Free Radic Biol Med*, 33 (6), 774-97.
- Hashimoto, E., et al. (1994), 'Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart', *Am J Physiol*, 267 (5 Pt 2), H1948-54.
- Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2009), 'Cardioprotective growth factors', *Cardiovasc Res*, 83 (2), 179-94.
- Hausenloy, D. J., Duchen, M. R., and Yellon, D. M. (2003), 'Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury', *Cardiovasc Res*, 60 (3), 617-25.
- Hearse, D. J., Humphrey, S. M., and Chain, E. B. (1973), 'Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release', *J Mol Cell Cardiol*, 5 (4), 395-407.
- Heinecke, J. W., et al. (1993), 'Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins', *J Clin Invest*, 91 (6), 2866-72.
- Heinecke, J. and Molkentin, J. D. (2006), 'Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (8), 589-600.
- Hernandez, R., Teruel, T., and Lorenzo, M. (2003), 'Insulin and dexamethasone induce GLUT4 gene expression in foetal brown adipocytes: synergistic effect through CCAAT/enhancer-binding protein alpha', *Biochem J*, 372 (Pt 2), 617-24.
- Heyndrickx, G. R., et al. (1975), 'Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs', *J Clin Invest*, 56 (4), 978-85.
- Hinz, B., et al. (2001), 'Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation', *Am J Pathol*, 159 (3), 1009-20.
- Hoggard, N., et al. (1997), 'Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (20), 11073-8.
- Hong, J. H., et al. (2004), 'Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats', *Clin Chim Acta*, 340 (1-2), 107-15.
- Hosoya, M., et al. (2000), 'Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin', *J Biol Chem*, 275 (28), 21061-7.
- Hotta, K., et al. (2000), 'Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (6), 1595-9.
- Hou, M., et al. (2011), 'Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats', *PLoS One*, 6 (11), e25726.
- Hutchins, G. M. and Bulkley, B. H. (1978), 'Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction', *Am J Cardiol*, 41 (7), 1127-32.

- Hutley, L. and Prins, J. B. (2005), 'Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome', *Am J Med Sci*, 330 (6), 280-9.
- Hwang, D. M., et al. (1997), 'A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes', *Circulation*, 96 (12), 4146-203.
- Inge, T. H., et al. (2004), 'A multidisciplinary approach to the adolescent bariatric surgical patient', *J Pediatr Surg*, 39 (3), 442-7; discussion 46-7.
- James, D. E., Strube, M., and Mueckler, M. (1989), 'Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter', *Nature*, 338 (6210), 83-7.
- Janssens, S., et al. (2004), 'Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction', *Circ Res*, 94 (9), 1256-62.
- Jennings, R. B., et al. (1960), 'Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog', *Arch Pathol*, 70, 68-78.
- Jennings, R. B., et al. (1983), 'Comparison of the effect of ischaemia and anoxia on the sarcolemma of the dog heart', *Eur Heart J*, 4 Suppl H, 123-37.
- Jimerson, D. C., et al. (2000), 'Decreased serum leptin in bulimia nervosa', *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (12), 4511-4.
- Jocken, J. W., et al. (2007), 'Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state', *J Clin Endocrinol Metab*, 92 (6), 2292-9.
- Johar, S., et al. (2006), 'Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase', *FASEB J*, 20 (9), 1546-8.
- Jones, S. P., et al. (2000), 'Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279 (5), H2196-201.
- Josephson, R. A., et al. (1991), 'Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes', *J Biol Chem*, 266 (4), 2354-61.
- Kadowaki, T., et al. (2003), 'Molecular mechanism of insulin resistance and obesity', *Exp Biol Med (Maywood)*, 228 (10), 1111-7.
- Kandasamy, A. D., et al. (2010), 'Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix', *Cardiovasc Res*, 85 (3), 413-23.
- Kang, S. W., et al. (1998), 'Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α ', *J Biol Chem*, 273 (11), 6297-302.
- Kannel, W. B., et al. (1967), 'The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study', *Ann Intern Med*, 67 (1), 48-59.
- Kant, A. K. (2003), 'Interaction of body mass index and attempt to lose weight in a national sample of US adults: association with reported food and nutrient intake, and biomarkers', *Eur J Clin Nutr*, 57 (2), 249-59.
- Kappeler, L., et al. (2009), 'Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice', *Endocrinology*, 150 (1), 314-23.
- Kastelein, J. J., et al. (2008), 'Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment', *Circulation*, 117 (23), 3002-9.
- Kathrotia, R. G., et al. (2010), 'Impact of different grades of body mass index on left ventricular structure and function', *Indian J Physiol Pharmacol*, 54 (2), 149-56.

- Kaung, H. L. (1994), 'Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat', *Dev Dyn*, 200 (2), 163-75.
- Kawamata, Y., et al. (2001), 'Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding', *Biochim Biophys Acta*, 1538 (2-3), 162-71.
- Keaney, J. F., Jr., et al. (2003), 'Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (3), 434-9.
- Kelly, B. D., et al. (2003), 'Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1', *Circ Res*, 93 (11), 1074-81.
- Kenchaiah, S., et al. (2002), 'Obesity and the risk of heart failure', *N Engl J Med*, 347 (5), 305-13.
- Kleinz, M. J. and Davenport, A. P. (2004), 'Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells', *Regul Pept*, 118 (3), 119-25.
- Kleinz, M. J., Skepper, J. N., and Davenport, A. P. (2005), 'Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells', *Regul Pept*, 126 (3), 233-40.
- Kloner, R. A. and Jennings, R. B. (2001), 'Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1', *Circulation*, 104 (24), 2981-9.
- Kraegen, E. W., et al. (2001), 'Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia', *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109 (4), S516-26.
- Krause, B. R. and Hartman, A. D. (1984), 'Adipose tissue and cholesterol metabolism', *J Lipid Res*, 25 (2), 97-110.
- Krieger-Brauer, H. I., Medda, P. K., and Kather, H. (1997), 'Insulin-induced activation of NADPH-dependent H₂O₂ generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by Galphai2', *J Biol Chem*, 272 (15), 10135-43.
- Kuhn, H. and O'Donnell, V. B. (2006), 'Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases', *Prog Lipid Res*, 45 (4), 334-56.
- Kumada, M., et al. (2003), 'Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23 (1), 85-9.
- Kusminski, C. M., McTernan, P. G., and Kumar, S. (2005), 'Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes', *Clin Sci (Lond)*, 109 (3), 243-56.
- Ladilov, Y. V., et al. (1997), 'Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture', *Circ Res*, 80 (1), 69-75.
- Laight, D. W., et al. (1999), 'F₂-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E', *European Journal of Pharmacology*, 377 (1), 89-92.
- Lamon-Fava, S., Wilson, P. W., and Schaefer, E. J. (1996), 'Impact of body mass index on coronary heart disease risk factors in men and women. The Framingham Offspring Study', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16 (12), 1509-15.
- Landmesser, U., et al. (2003), 'Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension', *J Clin Invest*, 111 (8), 1201-9.
- Lanza, G. A., Careri, G., and Crea, F. (2011), 'Mechanisms of coronary artery spasm', *Circulation*, 124 (16), 1774-82.

- Lass, A., et al. (1998), 'Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria', *Free Radic Biol Med*, 25 (9), 1089-97.
- Laughlin, M. R., et al. (1993), 'Pyruvate and lactate metabolism in the in vivo dog heart', *Am J Physiol*, 264 (6 Pt 2), H2068-79.
- Le Lay, S., et al. (2001), 'Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes', *J Biol Chem*, 276 (20), 16904-10.
- Lee, D. K., et al. (2000), 'Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor', *J Neurochem*, 74 (1), 34-41.
- Lee, Y., et al. (2001), 'Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia', *J Biol Chem*, 276 (8), 5629-35.
- Leopoldo, A. S., et al. (2011), 'Involvement of L-type calcium channel and SERCA2a in myocardial dysfunction induced by obesity', *J Cell Physiol*, 226 (11), 2934-42.
- Levine, R. L. (2002), 'Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease', *Free Radic Biol Med*, 32 (9), 790-6.
- Levy, B., et al. (2007), 'Myocardial lactate deprivation is associated with decreased cardiovascular performance, decreased myocardial energetics, and early death in endotoxic shock', *Intensive Care Med*, 33 (3), 495-502.
- Li, F., et al. (1996), 'Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development', *J Mol Cell Cardiol*, 28 (8), 1737-46.
- Li, S. Y., et al. (2006), 'Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch', *Diabetologia*, 49 (6), 1434-46.
- Li, Y., et al. (1995), 'Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase', *Nat Genet*, 11 (4), 376-81.
- Lijnen, P. J., Petrov, V. V., and Fagard, R. H. (2000), 'Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1)', *Mol Genet Metab*, 71 (1-2), 418-35.
- Lim, S. Y., et al. (2008), 'The novel adipocytokine visfatin exerts direct cardioprotective effects', *J Cell Mol Med*, 12 (4), 1395-403.
- Lopaschuk, G. D. and Stanley, W. C. (1997), 'Glucose metabolism in the ischemic heart', *Circulation*, 95 (2), 313-5.
- Lopaschuk, G. D., et al. (2010), 'Myocardial fatty acid metabolism in health and disease', *Physiol Rev*, 90 (1), 207-58.
- Lopez-Candales, A. (2001), 'Metabolic syndrome X: a comprehensive review of the pathophysiology and recommended therapy', *J Med*, 32 (5-6), 283-300.
- Lopez, M., et al. (2005), 'A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat', *Diabetologia*, 48 (1), 140-8.
- Lorgis, L., et al. (2010), 'The free oxygen radicals test (FORT) to assess circulating oxidative stress in patients with acute myocardial infarction', *Atherosclerosis*, 213 (2), 616-21.
- Lotzer, K., Funk, C. D., and Habenicht, A. J. (2005), 'The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis', *Biochim Biophys Acta*, 1736 (1), 30-7.
- Lundgren, M., et al. (2007), 'Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and "hyperleptinaemia", *Diabetologia*, 50 (3), 625-33.

- Maeda, N., et al. (2002), 'Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30', *Nat Med*, 8 (7), 731-7.
- Maffei, M., et al. (1995), 'Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects', *Nat Med*, 1 (11), 1155-61.
- Malnick, S. D. and Knobler, H. (2006), 'The medical complications of obesity', *QJM*, 99 (9), 565-79.
- Manasek, F. J. (1968), 'Mitosis in developing cardiac muscle', *J Cell Biol*, 37 (1), 191-6.
- Marla, S. S., Lee, J., and Groves, J. T. (1997), 'Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (26), 14243-8.
- Marsh, J. B. (2003), 'Lipoprotein metabolism in obesity and diabetes: insights from stable isotope kinetic studies in humans', *Nutr Rev*, 61 (11), 363-75.
- Mates, J. M., Perez-Gomez, C., and Nunez de Castro, I. (1999), 'Antioxidant enzymes and human diseases', *Clin Biochem*, 32 (8), 595-603.
- Matsushima, S., et al. (2006), 'Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice', *Circulation*, 113 (14), 1779-86.
- Matsuzawa-Nagata, N., et al. (2008), 'Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity', *Metabolism*, 57 (8), 1071-7.
- Matsuzawa, Y. (2006), 'The metabolic syndrome and adipocytokines', *FEBS Lett*, 580 (12), 2917-21.
- McMillan, K. and Masters, B. S. (1995), 'Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415', *Biochemistry*, 34 (11), 3686-93.
- Meister, B. (2000), 'Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus', *Vitam Horm*, 59, 265-304.
- Melanson, K. J., et al. (2001), 'Obesity and cardiovascular disease risk: research update', *Cardiol Rev*, 9 (4), 202-7.
- Messerli, F. H. (1986), 'Cardiopathy of obesity--a not-so-Victorian disease', *N Engl J Med*, 314 (6), 378-80.
- Mezzetti, A., et al. (1998), 'Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases', *Free Radic Biol Med*, 25 (6), 676-81.
- Milstien, S. and Katusic, Z. (1999), 'Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function', *Biochem Biophys Res Commun*, 263 (3), 681-4.
- Minn, A. H., et al. (2003), 'Resistin is expressed in pancreatic islets', *Biochem Biophys Res Commun*, 310 (2), 641-5.
- Misra, M. K., et al. (2009), 'Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes', *Med Sci Monit*, 15 (10), RA209-19.
- Miyauchi, Y., et al. (2003), 'Altered atrial electrical restitution and heterogeneous sympathetic hyperinnervation in hearts with chronic left ventricular myocardial infarction: implications for atrial fibrillation', *Circulation*, 108 (3), 360-6.
- Modan, M., et al. (1985), 'Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance', *J Clin Invest*, 75 (3), 809-17.
- Mokdad, A. H., et al. (2000), 'Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998', *Diabetes Care*, 23 (9), 1278-83.

- Molina, J. M., et al. (1989), 'Decreased activation rate of insulin-stimulated glucose transport in adipocytes from obese subjects', *Diabetes*, 38 (8), 991-5.
- Moor de Burgos, A., Wartanowicz, M., and Ziemlanski, S. (1992), 'Blood vitamin and lipid levels in overweight and obese women', *Eur J Clin Nutr*, 46 (11), 803-8.
- Morash, B., et al. (1999), 'Leptin gene expression in the brain and pituitary gland', *Endocrinology*, 140 (12), 5995-8.
- Moreira, A. S., et al. (2009), 'Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life', *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19 (11), 805-10.
- Moumen, R., et al. (1997), 'Plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *J Neurol Sci*, 151 (1), 35-9.
- Munzberg, H. (2008), 'Differential leptin access into the brain--a hierarchical organization of hypothalamic leptin target sites?', *Physiol Behav*, 94 (5), 664-9.
- Nakagami, H., Takemoto, M., and Liao, J. K. (2003), 'NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy', *J Mol Cell Cardiol*, 35 (7), 851-9.
- Niki, E., et al. (1984), 'Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C', *J Biol Chem*, 259 (7), 4177-82.
- Nojiri, H., et al. (2006), 'Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration', *J Biol Chem*, 281 (44), 33789-801.
- Norton, G. R., et al. (2009), 'The relationship between blood pressure and left ventricular mass index depends on an excess adiposity', *J Hypertens*, 27 (9), 1873-83.
- ObEpi-Roche (2009), '5e édition de l'enquête nationale sur la prévalence de l'obésité et du surpoids en France'.
- Oh, Y. S., et al. (2006), 'Spatial distribution of nerve sprouting after myocardial infarction in mice', *Heart Rhythm*, 3 (6), 728-36.
- Ohashi, K., et al. (2006), 'Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension', *Hypertension*, 47 (6), 1108-16.
- Olivetti, G., et al. (1996), 'Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart', *J Mol Cell Cardiol*, 28 (7), 1463-77.
- Oparil, S., Bishop, S. P., and Clubb, F. J., Jr. (1984), 'Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia', *Hypertension*, 6 (6 Pt 2), III38-43.
- Opie, L. H. (1969), 'Metabolism of the heart in health and disease. II', *Am Heart J*, 77 (1), 100-22 contd.
- Opie, L. H. (1975), 'Metabolism of free fatty acids, glucose and catecholamines in acute myocardial infarction. Relation to myocardial ischemia and infarct size', *Am J Cardiol*, 36 (7), 938-53.
- Opie, L. H. (1989), 'Reperfusion injury and its pharmacologic modification', *Circulation*, 80 (4), 1049-62.
- Otero, M., et al. (2005), 'Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights', *FEBS Lett*, 579 (2), 295-301.
- Oudot, A., et al. (2006), 'NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging', *Free Radic Biol Med*, 40 (12), 2214-22.
- Oxman, T., et al. (1997), 'Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia', *Am J Physiol*, 273 (4 Pt 2), H1707-12.
- Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007), 'Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease', *Physiol Rev*, 87 (1), 315-424.

- Palatini, P. (2001), 'Sympathetic overactivity in hypertension: a risk factor for cardiovascular disease', *Curr Hypertens Rep*, 3 Suppl 1, S3-9.
- Palmer, R. M., Ashton, D. S., and Moncada, S. (1988), 'Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine', *Nature*, 333 (6174), 664-6.
- Palmieri, V., et al. (2001), 'Relation of various degrees of body mass index in patients with systemic hypertension to left ventricular mass, cardiac output, and peripheral resistance (The Hypertension Genetic Epidemiology Network Study)', *Am J Cardiol*, 88 (10), 1163-8.
- Pamplona, R., et al. (2000), 'Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals', *Mech Ageing Dev*, 112 (3), 169-83.
- Pan, C. H., Wen, C. H., and Lin, C. S. (2008), 'Interplay of angiotensin II and angiotensin(1-7) in the regulation of matrix metalloproteinases of human cardiocytes', *Exp Physiol*, 93 (5), 599-612.
- Park, J. L. and Lucchesi, B. R. (1999), 'Mechanisms of myocardial reperfusion injury', *Ann Thorac Surg*, 68 (5), 1905-12.
- Pelkman, C. L., et al. (2004), 'Effects of moderate-fat (from monounsaturated fat) and low-fat weight-loss diets on the serum lipid profile in overweight and obese men and women', *Am J Clin Nutr*, 79 (2), 204-12.
- Pelleymounter, M. A., et al. (1995), 'Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice', *Science*, 269 (5223), 540-3.
- Perego, L., et al. (2005), 'Circulating leptin correlates with left ventricular mass in morbid (grade III) obesity before and after weight loss induced by bariatric surgery: a potential role for leptin in mediating human left ventricular hypertrophy', *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (7), 4087-93.
- Pereira, R. O., et al. (2006), 'Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts', *Regul Pept*, 136 (1-3), 117-21.
- Petersen, K. F. and Shulman, G. I. (2002), 'Cellular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle', *J R Soc Med*, 95 Suppl 42, 8-13.
- Phelps, R. L., Metzger, B. E., and Freinkel, N. (1981), 'Carbohydrate metabolism in pregnancy. XVII. Diurnal profiles of plasma glucose, insulin, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, and individual amino acids in late normal pregnancy', *Am J Obstet Gynecol*, 140 (7), 730-6.
- Pichardo, J., et al. (1999), 'Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats', *Mol Cell Biochem*, 196 (1-2), 51-7.
- Pineiro, R., et al. (2005), 'Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes', *FEBS Lett*, 579 (23), 5163-9.
- Pirola, J. S., Hutchins, G. M., and Moore, G. W. (1986), 'Infarct expansion: pathologic analysis of 204 patients with a single myocardial infarct', *J Am Coll Cardiol*, 7 (2), 349-54.
- Plagemann, A., et al. (1992), 'Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding', *Exp Clin Endocrinol*, 99 (3), 154-8.
- Plagemann, A., et al. (1999), 'Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats', *Brain Res*, 836 (1-2), 146-55.
- Podrez, E. A., et al. (1999), 'Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro', *J Clin Invest*, 103 (11), 1547-60.

- Pou, K. M., et al. (2007), 'Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study', *Circulation*, 116 (11), 1234-41.
- Rajagopalan, S., et al. (1996), 'Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone', *J Clin Invest*, 97 (8), 1916-23.
- Rajapurohitam, V., et al. (2003), 'The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes', *Circ Res*, 93 (4), 277-9.
- Rajia, S., Chen, H., and Morris, M. J. (2010), 'Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet', *J Neuroendocrinol*, 22 (8), 905-14.
- Reaux, A., et al. (2002), 'Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain', *Neuroscience*, 113 (3), 653-62.
- Reaven, G. M. (1988), 'Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease', *Diabetes*, 37 (12), 1595-607.
- Reaven, G. M. (2006), 'The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary?', *Am J Clin Nutr*, 83 (6), 1237-47.
- Reimer, K. A., et al. (1977), 'The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs', *Circulation*, 56 (5), 786-94.
- Ren, J. (2004), 'Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function', *J Endocrinol*, 181 (1), 1-10.
- Richards, M. K. and Marletta, M. A. (1994), 'Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system', *Biochemistry*, 33 (49), 14723-32.
- Rider, O. J., et al. (2011), 'Ventricular hypertrophy and cavity dilatation in relation to body mass index in women with uncomplicated obesity', *Heart*, 97 (3), 203-8.
- Roberts, M. J., et al. (1990), 'Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty', *Lancet*, 336 (8708), 143-5.
- Rochette, L. and Maupoil, V. (1993), '[From ischemia to reperfusion lesions]', *Arch Mal Coeur Vaiss*, 86 Spec No 4, 13-7.
- Rodrigues, A. L., et al. (2007), 'Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition', *J Endocrinol*, 195 (3), 485-94.
- Rodrigues, A. L., et al. (2011), 'Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats', *J Nutr Biochem*, 22 (2), 109-17.
- Rossi, F. and Zatti, M. (1964), 'Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells', *Experientia*, 20 (1), 21-3.
- Ruiz-Meana, M., et al. (2009), 'Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297 (4), H1281-9.
- Russo, C., et al. (2011), 'Effect of obesity and overweight on left ventricular diastolic function: a community-based study in an elderly cohort', *J Am Coll Cardiol*, 57 (12), 1368-74.
- Saltiel, A. R. and Kahn, C. R. (2001), 'Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism', *Nature*, 414 (6865), 799-806.

- Satoh, N., et al. (1999), 'Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion', *Diabetes*, 48 (9), 1787-93.
- Schulze, P. C., et al. (2003), 'Elevated serum levels of leptin and soluble leptin receptor in patients with advanced chronic heart failure', *Eur J Heart Fail*, 5 (1), 33-40.
- Scott, I. C., et al. (2007), 'The g protein-coupled receptor agtrl1b regulates early development of myocardial progenitors', *Dev Cell*, 12 (3), 403-13.
- Sen, C. K., Khanna, S., and Roy, S. (2006), 'Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols', *Life Sci*, 78 (18), 2088-98.
- Sethi, J. K. and Vidal-Puig, A. (2005), 'Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes?', *Trends Mol Med*, 11 (8), 344-7.
- Sharov, V. G., et al. (1997), 'Abnormalities of cardiocytes in regions bordering fibrous scars of dogs with heart failure', *Int J Cardiol*, 60 (3), 273-9.
- Shek, E. W., Brands, M. W., and Hall, J. E. (1998), 'Chronic leptin infusion increases arterial pressure', *Hypertension*, 31 (1 Pt 2), 409-14.
- Shepherd, P. R. and Kahn, B. B. (1999), 'Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus', *N Engl J Med*, 341 (4), 248-57.
- Shibata, R., et al. (2004), 'Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart', *Nat Med*, 10 (12), 1384-9.
- Shimada, K., Miyazaki, T., and Daida, H. (2004), 'Adiponectin and atherosclerotic disease', *Clin Chim Acta*, 344 (1-2), 1-12.
- Sicard, P., et al. (2006), 'Dissociation between vascular oxidative stress and cardiovascular function in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats', *Vascul Pharmacol*, 45 (2), 112-21.
- Siegmund, B., Zude, R., and Piper, H. M. (1992), 'Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca²⁺ overload', *Am J Physiol*, 263 (4 Pt 2), H1262-9.
- Siegmund, B., et al. (1997), 'Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture', *Circulation*, 96 (12), 4372-9.
- Sierra-Honigmann, M. R., et al. (1998), 'Biological action of leptin as an angiogenic factor', *Science*, 281 (5383), 1683-6.
- Silha, J. V., et al. (2003), 'Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance', *Eur J Endocrinol*, 149 (4), 331-5.
- Simpkin, J. C., et al. (2007), 'Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury', *Basic Res Cardiol*, 102 (6), 518-28.
- Sivanandam, S., et al. (2006), 'Relation of increase in adiposity to increase in left ventricular mass from childhood to young adulthood', *Am J Cardiol*, 98 (3), 411-5.
- Siwik, D. A., Chang, D. L., and Colucci, W. S. (2000), 'Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro', *Circ Res*, 86 (12), 1259-65.
- Slieker, L. J., et al. (1996), 'Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP', *J Biol Chem*, 271 (10), 5301-4.
- Smith-Kirwin, S. M., et al. (1998), 'Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk', *J Clin Endocrinol Metab*, 83 (5), 1810-3.

- Smith, C. C. and Yellon, D. M. (2011), 'Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection', *Pharmacol Ther*, 129 (2), 206-19.
- Smith, C. C., et al. (2007), 'Temporal changes in myocardial salvage kinases during reperfusion following ischemia: studies involving the cardioprotective adipocytokine apelin', *Cardiovasc Drugs Ther*, 21 (6), 409-14.
- Smith, C. C., et al. (2010), 'Leptin-induced cardioprotection involves JAK/STAT signaling that may be linked to the mitochondrial permeability transition pore', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299 (4), H1265-70.
- Soonpaa, M. H. and Field, L. J. (1997), 'Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts', *Am J Physiol*, 272 (1 Pt 2), H220-6.
- Soonpaa, M. H., et al. (1996), 'Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development', *Am J Physiol*, 271 (5 Pt 2), H2183-9.
- Spalding, K. L., et al. (2008), 'Dynamics of fat cell turnover in humans', *Nature*, 453 (7196), 783-7.
- Stacy, L. B., et al. (2007), 'Effect of angiotensin II on primary cardiac fibroblast matrix metalloproteinase activities', *Perfusion*, 22 (1), 51-5.
- Stettler, N., et al. (2005), 'Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula', *Circulation*, 111 (15), 1897-903.
- Sun, Y. and Weber, K. T. (2000), 'Infarct scar: a dynamic tissue', *Cardiovasc Res*, 46 (2), 250-6.
- Suzuki, K., et al. (2003), 'Relationship between obesity and serum markers of oxidative stress and inflammation in Japanese', *Asian Pac J Cancer Prev*, 4 (3), 259-66.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007), 'Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics', *Nat Rev Drug Discov*, 6 (8), 662-80.
- Szokodi, I., et al. (2002), 'Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility', *Circ Res*, 91 (5), 434-40.
- Taghibiglou, C., et al. (2000), 'Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model', *J Biol Chem*, 275 (12), 8416-25.
- Tamamori, M., et al. (1997), 'Stimulation of collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts by exposure to hypoxic culture conditions and suppression of the effect by natriuretic peptides', *Cell Biol Int*, 21 (3), 175-80.
- Taskinen, M. R., et al. (1982), 'Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity', *Diabetologia*, 22 (1), 46-50.
- Tatemoto, K., et al. (1983), 'Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine', *FEBS Lett*, 164 (1), 124-8.
- Tatemoto, K., et al. (2001), 'The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism', *Regul Pept*, 99 (2-3), 87-92.
- Tatemoto, K., et al. (1998), 'Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor', *Biochem Biophys Res Commun*, 251 (2), 471-6.

- Thakker, G. D., et al. (2006), 'Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291 (5), H2504-14.
- Thomas, M., et al. (2006), 'Deletion of p47phox attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice', *Circulation*, 114 (5), 404-13.
- Timpson, N. J., et al. (2009), 'Does greater adiposity increase blood pressure and hypertension risk?: Mendelian randomization using the FTO/MC4R genotype', *Hypertension*, 54 (1), 84-90.
- Trayhurn, P. and Beattie, J. H. (2001), 'Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ', *Proc Nutr Soc*, 60 (3), 329-39.
- Turner, N. A., et al. (2007), 'Selective gene silencing of either MMP-2 or MMP-9 inhibits invasion of human saphenous vein smooth muscle cells', *Atherosclerosis*, 193 (1), 36-43.
- Umemura, S., et al. (1997), 'Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients', *Am J Hypertens*, 10 (6), 629-33.
- Urakawa, H., et al. (2003), 'Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men', *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (10), 4673-6.
- Valverde, A. M., et al. (1999), 'Insulin and insulin-like growth factor I up-regulate GLUT4 gene expression in fetal brown adipocytes, in a phosphoinositide 3-kinase-dependent manner', *Biochem J*, 337 (Pt 3), 397-405.
- Vasquez-Vivar, J., et al. (1998), 'Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (16), 9220-5.
- Velkoska, E., Cole, T. J., and Morris, M. J. (2005), 'Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288 (6), E1236-43.
- Velkoska, E., et al. (2008), 'Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats', *J Nutr*, 138 (9), 1622-7.
- Vergely, C, et al. (1998), 'Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on post-ischemic recovery during reperfusion', *Free Radical Biology & Medicine*, 24 (3), 470-79.
- Vergely, C., et al. (2004), 'Vitamin C deficiency exerts paradoxical cardiovascular effects in osteogenic disorder Shionogi (ODS) rats', *J Nutr*, 134 (4), 729-35.
- Vergely, Catherine, et al. (2001), 'Isolated perfused rat hearts release secondary free radicals during ischemia reperfusion injury. Cardiovascular effect of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron', *Free Radical Research*, 35, 475-89.
- Verges, B. (2005), 'New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes', *Diabetes Metab*, 31 (5), 429-39.
- Viaro, F., Nobre, F., and Evora, P. R. (2000), 'Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases', *Arq Bras Cardiol*, 74 (4), 380-93.
- Vincent, H. K., et al. (1999), 'Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress', *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23 (1), 67-74.
- Voits, M., et al. (1996), 'Obesity induced by unspecific early postnatal overfeeding in male and female rats: hypophagic effect of CCK-8S', *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 354 (3), 374-8.

- von Kries, R., et al. (1999), 'Breast feeding and obesity: cross sectional study', *BMJ*, 319 (7203), 147-50.
- Wang, J., et al. (1998), 'A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat', *Nature*, 393 (6686), 684-8.
- Wang, T. J., et al. (2004), 'Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation', *JAMA*, 292 (20), 2471-7.
- Wang, Z. V. and Scherer, P. E. (2008), 'Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension', *Hypertension*, 51 (1), 8-14.
- Waterland, R. A. and Garza, C. (1999), 'Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease', *Am J Clin Nutr*, 69 (2), 179-97.
- Waterland, R. A. and Garza, C. (2002), 'Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats', *J Nutr*, 132 (3), 357-64.
- Weikert, C., et al. (2008), 'Plasma resistin levels and risk of myocardial infarction and ischemic stroke', *J Clin Endocrinol Metab*, 93 (7), 2647-53.
- Welch, W. J. (1992), 'Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease', *Physiol Rev*, 72 (4), 1063-81.
- Wolf, A. M., et al. (2004), 'Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes', *Biochem Biophys Res Commun*, 323 (2), 630-5.
- Wolin, M. S. (1996), 'Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms', *Microcirculation*, 3 (1), 1-17.
- Wong, C. Y., et al. (2004), 'Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity', *Circulation*, 110 (19), 3081-7.
- Woo, M., et al. (2011), 'Early life nutrition modulates muscle stem cell number: implications for muscle mass and repair', *Stem Cells Dev*, 20 (10), 1763-9.
- Xu, J., et al. (2006), 'Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26 (12), 2688-95.
- Yagyu, H., et al. (2003), 'Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy', *J Clin Invest*, 111 (3), 419-26.
- Yamagishi, S. I., et al. (2001), 'Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A', *J Biol Chem*, 276 (27), 25096-100.
- Yang, F., et al. (2002), 'Myocardial infarction and cardiac remodeling in mice', *Exp Physiol*, 87 (5), 547-55.
- Yang, R. and Barouch, L. A. (2007), 'Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences', *Circ Res*, 101 (6), 545-59.
- Yasue, S., et al. (2010), 'Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy', *Am J Hypertens*, 23 (4), 425-31.
- Yim, H. E., et al. (2011), 'Postnatal early overnutrition dysregulates the intrarenal renin-angiotensin system and extracellular matrix-linked molecules in juvenile male rats', *J Nutr Biochem*.
- Yura, S., et al. (2003), 'Resistin is expressed in the human placenta', *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (3), 1394-7.

- Zhang, Y., et al. (1994), 'Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue', *Nature*, 372 (6505), 425-32.
- Zhao, L. and Funk, C. D. (2004), 'Lipoxygenase pathways in atherogenesis', *Trends Cardiovasc Med*, 14 (5), 191-5.
- Zhao, W., et al. (2009), 'Reactive oxygen species promote angiogenesis in the infarcted rat heart', *Int J Exp Pathol*, 90 (6), 621-9.
- Zhou, S., et al. (2004), 'Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs', *Circ Res*, 95 (1), 76-83.

Liste des communications

Communications orales

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C., Rochette, L., Vergely, C. Metabolic and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in mice. “ *Forum des Jeunes Chercheurs (FJC)* ”, Juin 2010, Besançon, France.

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C., Rochette, L., Vergely, C. Metabolic and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in mice. “ *Printemps de la Cardiologie* ”, 12-14 Mai 2011, Lyon, France.

Habbout, A., Rigal, E., Lorin, J., Guenancia, C., Fassot, C., Rochette, L., Vergely, C. Early-induced overweight causes rapid changes in heart genomic expression and long-term cardiovascular, metabolic and oxidative alteration in mice. “ *Printemps de la Cardiologie* ”, 12-13 Avril 2012, Bordeaux, France.

Communications affichées

Habbout, A., Delemasure, S., Sediki, M., Rochette, L., Vergely, C. Metabolic, oxidative and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in rats. “ *Congrès annuel du Groupe de Reflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC)* ”, 2-3 avril 2009, Nancy, France.

Habbout, A., Delemasure, S., Sediki, M., Rochette, L., Vergely, C. Metabolic, oxidative and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in rats. “ *Forum des Jeunes Chercheurs (FJC)* ”, Juin 2009, Dijon, France.

Habbout, A., Delemasure, S., Sediki, M., Rochette, L., Vergely, C. Metabolic, oxidative and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in rats. “ *Congrès annuel de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T)* ”, 23-25 mars 2010, Bordeaux, France.

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C., Rochette, L., Vergely, C. Metabolic and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in mice. “ *Congrès annuel du Groupe de Reflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC)* ”, 15-17 avril 2010, Nantes, France.

Habbout, A., Delemasure, S., **Guilland, J-C.**, Rochette, L., Vergely, C. Metabolic, oxidative and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in rats. “ *XIème Congrès International de la Société Francophone Vitamines et Biofacteurs (SFVB)* ”, 22-24 septembre 2010, Monastir, Tunisie.

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C.,Guilland, J-C.,Rochette, L., **Vergely, C.** Metabolic, oxidative and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in mice. “ *Congrès international de la Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM)* ”, 17-21 novembre 2010, Orlando, Etats-Unis.

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C.,Guilland, J-C.,Rochette, L., Vergely, C. Metabolic, oxidative and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in mice. “ *Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie (JESFC)* ”, 12-14 Janvier 2011, Paris, France.

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C., Rochette, L., Vergely, C. Metabolic and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in mice. “ *Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T)* ”, 22-24 Mars 2011, Grenoble, France.

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C., Rochette, L., Vergely, C. Metabolic and cardiovascular consequences of postnatal overfeeding in mice. “ *Printemps de la Cardiologie* ”, 12-14 Mai 2011, Lyon, France.

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C., Rochette, L., Vergely, C. Postnatal Overfeeding in Mice Leads to Overweight and to Cardiometabolic and Oxidative Alterations in Adulthood. “ **Congrès international** de l’*American Heart Association (AHA)* ”, 12-16 Novembre 2011, Orlando, Etats-Unis.

Habbout, A., Delemasure, S., Richard, C.,Rochette, L., **Vergely, C.** Postnatal Overfeeding in Mice Leads to Overweight and to Cardiometabolic and Oxidative Alterations in Adulthood. “ *Congrès international de la Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM)* ”, 16-20 novembre 2011, Atlanta, Etats-Unis.

Habbout, A., Rigal, E., Lorin, J., Guenancia, C., Fassot, C., Rochette, L., Vergely, C. Early-induced overweight causes rapid changes in heart genomic expression and long-term cardiovascular, metabolic and oxidative alteration in mice. “ *Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T)* ”, 4-6 Avril 2012, Dijon, France.

Habbout, A., Rigal, E., Lorin, J., Guenancia, C., Fassot, C., Rochette, L., Vergely, C. Early-induced overweight causes rapid changes in heart genomic expression and long-term cardiovascular, metabolic and oxidative alteration in mice. “ *Printemps de la Cardiologie* ”, 12-13 Avril 2012, Bordeaux, France.

Liste des publications

Publications

Habbout A., Delemasure S., Goirand F., Guillard J-C., Chabod F., Sediki M., Rochette L., Vergely C. *Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood.*

Article accepté dans *Biochimie*.

Habbout A., Rigal, E., Lorin, J., Guenancia, C., Fassot, C., Rochette, L., Vergely, C. *Postnatal overfeeding in mice leads to cardiovascular and metabolic alterations, and to a higher susceptibility of myocardium to ischemia reperfusion injury.*

Article soumis à *Circulation Research*.

Deckert V., Kretz B., **Habbout A.**, Raghay K., Abello N., Gautier T., Desrumeaux C., Le Guern N., Masson D., Steinmetz E., Lagrost L. *Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency prevents the formation of abdominal aortic aneurysm.*

Article en preparation