Programmation postnatale du risque cardio-métabolique : effets d'une restriction calorique modérée à l'âge adulte

Na Li

▶ **To cite this version:**

Na Li. Programmation postnatale du risque cardio-métabolique : effets d'une restriction calorique modérée à l'âge adulte. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DIJOS017 . tel-01484144

HAL Id: tel-01484144
https://theses.hal.science/tel-01484144

Submitted on 6 Mar 2017

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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR des Sciences de Santé

Année 2016 Thèse n°

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline: Science de la vie

Spécialité : Physiopathologie Cardiovasculaire

Par Mme **Na LI**

Présentée et soutenue publiquement le 11 juillet 2016

PROGRAMMATION POSTNATALE DU RISQUE CARDIO-METABOLIQUE : EFFETS D'UNE RESTRICTION CALORIQUE MODEREE A L'AGE ADULTE

Thèse dirigée par le Professeur Catherine VERGELY

Composition du jury

Mme le Professeur Corinne Leloup, Université de Bourgogne -Franche-Comté	Examinateur
Mme le Docteur Nathalie Rosenblatt-Velin, Institut de Physiologie de Lausanne	Examinateur
Mme le Docteur Céline Fassot, Université d'Angers	Rapporteur
Mr le Professeur Luc Bertrand, Université catholique de Louvain	Rapporteur
Mme le Professeur Catherine Vergely, Université de Bourgogne -Franche-Comté	Directeur

Remerciements

A notre maître et directrice de thèse

Madame le Professeur Catherine VERGELY-VANDRIESSE

Tu as guidé mes premiers pas dans la recherche, tu m'as accompagnée et soutenue tout au long de ces quatre années de thèse. J'ai énormément apprécié ces quatre années passées à travailler ensemble, ta capacité à mettre en œuvre et à faire aboutir les projets successifs, ainsi que ta rigueur scientifique. De plus, tes qualités humaines, ton empathie notamment, contribuent grandement à la réussite de ceux-ci. Un grand merci pour ta confiance, tes conseils avisés, pondérés, et ton soutien dans les moments clés. Un grand merci également pour ta patience et tes efforts pour m'écouter et me comprendre avec mon « chino-français ».

A notre maître, Monsieur le Professeur Luc Rochette,

Je saisis l'occasion qui m'est offerte de vous témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance pour ce que vous nous apportez au quotidien. Vous êtes un modèle pour tous les étudiants, aimé et respecté. Votre curiosité, votre éveil perpétuel à la recherche et votre application quotidienne nous montrent clairement la voie à suivre.

A notre juge et rapporteur, Madame le Docteur Céline Fassot,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de consacrer du temps à la lecture de ce travail. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

A notre juge et rapporteur, Monsieur le Professeur Luc Bertrand,

Je vous suis reconnaissante pour votre disponibilité à participer à l'évaluation de ce manuscrit. Soyez assurée de ma gratitude et de mon profond respect.

A notre juge, Madame le Docteur Nathalie Rossenblatt,

Je vous suis très reconnaissante de me faire l'honneur d'être juge de ce travail scientifique. Soyez assurée de mon profond respect et de toute mon estime.

A notre juge, Madame le Professeur Corinne Leloup,

Je vous remercie profondément d'avoir accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur de ce travail de thèse. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire pour une collaboration et pour vos conseils scientifiques concernant la fonction mitochondriale.

Merci à Eve Rigal, notre Ingénieur d'Etudes, pour tes aides techniques, tes discussions scientifiques et amicales. Merci de consacrer du temps et de l'énergie à lire mon manuscrit et à corriger mon français.

Merci au Docteur Charles Guenancia pour tous les travaux que nous avons menés ensemble et tes précieux conseils scientifiques.

Merci à Abdelkader KAHLI, docteur en pharmacie et futur docteur, pour ta bonne humeur et les discussions diverses, scientifiques et culturelles. C'est agréable et enrichissant de partager le bureau ensemble.

Merci à Alexandre Méloux, notre interne en pharmacie, d'avoir passé du temps à corriger mon français pour ma thèse. J'ai bien apprécié cette dernière année de travail ensemble, pour toutes les discussions enrichissantes et tes conseils pharmaceutiques.

Merci à Ahmed, Julie, Lauranne de m'avoir donné beaucoup de conseils indispensables à l'acquisition des techniques et à l'initiation de mon projet de recherche au début de ma thèse.

Merci à Françoise Bechet, pour toutes les commandes que je lui demandais d'effectuer, pour son sourire et pour les discussions variées.

Merci à tous les autres membres du laboratoire : Dr Stéphanie Delemasure-Chalumeau, l'équipe COHIRO et aux stagiaires.

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

A mon mari Yongxin et notre petite Sophia, je vous remercie particulièrement pour tout le bonheur que vous m'apportez jour après jour. Yongxin, un grand merci pour ton soutien et tes conseils inestimables qui m'ont rendu encore plus forte. Mon petit ange, Sophia, ma source de bonheur.

A mes parents qui ont toujours cru en moi et m'ont toujours soutenue.

Avec tout mon Amour…

Résumé

La suralimentation postnatale (SAPN) chez les rongeurs induit des modifications cardio-métaboliques à l'âge adulte. Notre objectif a été de déterminer si une restriction calorique (RC) modérée pouvait restaurer ces altérations cardio-métaboliques et améliorer la récupération post-ischémique dans un modèle de cœur perfusé in vitro.

Après la naissance, des souriceaux C57BL/6 ont été répartis au nombre de 9 par portée pour les groupes témoins (Normoalimentées: NA), ou au 3 par portée pour induire la SAPN. Après le sevrage, les souris ont eu un accès libre à une nourriture standard et à l'eau. A 6 mois, la moitié des souris des deux groupes a été soumise à une RC de 20% (NARC, SARC) pendant un mois, tandis que l'autre moitié a continué à se nourrir ad libitum (NAAL, SAAL). Des paramètres métaboliques et de la fonction cardiaque ont été évalués avant et après RC. A 7 mois, nous avons évalué au niveau du myocarde la sensibilité aux lésions d'ischémie-reperfusion et le niveau stress oxydant cardiaque.

Les souris SAPN adultes présentent un surpoids, une accumulation de graisses, une hyperleptinemie, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline, ainsi qu'une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG). Après un mois de RC, le poids corporel de SARC est revenu à la normale bien que ni la masse grasse ni la leptinémie n'aient diminué. Nous avons noté une amélioration du métabolisme au glucose et de la FEVG chez les souris SARC. Sur cœur isolé perfusé après 30 min d'ischémie globale, la taille de l'infarctus des souris SARC est la plus faible. La RC est associé à une amélioration de la fonction de la chaine respiratoire mitochondriale chez les souris SARC et à une diminution de la production des radicaux libres. Cependant, les effets bénéfiques de la RC n'ont pas été retrouvés pour la plupart des paramètres mesurés chez les souris NARC.

Notre étude a confirmé le rôle de la programmation de SAPN sur la fonction cardio-métabolique. Une RC modérée, à court terme, permet de diminuer le poids corporel, mais aussi d'améliorer le métabolisme du glucose, d'améliorer la fonction cardiaque et de diminuer la susceptibilité aux lésions d'ischémie-reperfusion chez les souris SAPN.

Mots clés : Suralimentation postnatale, restriction calorique, cardioprotection, mitochondrie, stress oxydant

Abstract

Postnatal overfeeding (PNOF) in rodents induces early programming of cardio-metabolic risk. Our aim was to determine if a moderate diet restriction could restore cardio-metabolic alterations induced by PNOF.

Immediately after birth, litters of C57BL/6 mice were either maintained at 9 (normal litter, NL), or reduced to 3 (small litter, SL) to induce PNOF. At weaning, all mice received a standard diet ad libitum (AL). At 6 month of age, half of the NL and SL mice were assigned to a moderate 20% calorie restriction (CR: NLCR, SLCR) for one month, while the other mice continued to eat AL (AL: NLAL, SLAL). Glucose and insulin tolerance tests, cardiac function (echocardiography), body composition (Echo-MRI), cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion injury, mitochondrial function, reactive oxygen species (ROS) generation (EPR spectroscopy) and insulin signaling were assessed before and/or after one month of CR.

Adult SL mice presented overweight, fat accumulation, hyperleptinemia, glucose intolerance, insulin resistance and decreased left ventricular ejection fraction (LVEF). After one month of moderate CR, body weight of SLCR was normalized to this of NLAL however their fat mass and leptinemia were not decreased. Glucose metabolism was improved and LVEF was increased In SLCR. After 30 min of global ischemia, hearts isolated from SLCR mice showed better recovery and smaller infarct size than this of others groups. CR increased the cardiac mitochondrial respiratory rate in SLCR mice whereas cardiac ROS production was significantly decreased in SLCR mice. Insulin signaling in heart was affected neither by PNOF nor by CR. Intriguingly, no difference was observed in NLCR mice for most of the parameters investigated.

Our results confirmed the programming of early overfeeding on metabolic and cardiac function. A short-term moderate CR in not only normalized body weight in SL mice but also ameliorate the metabolic programming and reverse the cardiac dysfunction induced by PNOF.

Keywords: postnatal programming, calorie restriction, cardioprotection, mitochondria, oxidative stress

Table des matières

I. INTRODUCTION GENERALE 9

A. SURPOIDS, OBESITE ET SYNDROME METABOLIQUE 10
1. Surpoids et obésité 10
2. Le syndrome métabolique 14
3. Conséquences cardiovasculaires de l'obésité 20
4. Obésité infantile et ses conséquences à long terme 22
B. PHYSIOPATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE 24
1. La croissance cardiaque : du fœtus à l'adulte 24
2. Le métabolisme cardiaque 26
3. La fonction mitochondriale 30
C. PROGRAMMATION PERINATALE DES MALADIES CARDIO-METABOLIQUES 33
1. L'hypothèse de Barker 33
2. Programmation postnatale : 34
3. Suralimentation postnatale 35
D. RESTRICTION CALORIQUE 50
1. Définition 50
2. Espérance de vie 50
3. Effet de la restriction calorique sur la fonction métabolique 51
4. Effet de restriction calorique sur la fonction cardiovasculaire 54
E. STRESS OXYDANT ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES 58
1. Définition du stress oxydant et des radicaux libres 58
2. Principales sources de radicaux libres 59
3. Les systèmes antioxydants 61
4. Les pathologies cardiovasculaires associées au stress oxydant 63
5. La restriction calorique et le stress oxydant 64

II. OBJECTIFS DU TRAVAIL 68

III. MATERIELS ET METHODES 71

A. MODELE ANIMAL ET PROTOCOLE DE RC 72
B. PROCEDURE EXPERIMENTALE 72
C. MESURE BIOCHIMIQUES PLASMATIQUES 74
D. TESTS TOLERANCE AU GLUCOSE ET A L'INSULINE (GTT ET ITT) 75
E. EVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE 75
1. Méthode in vivo d'échocardiographie 75
2. Méthode ex vivo de cœur isolé perfusé en mode Langendorff 78
F. ANALYSE DU STRESS OXYDANT CARDIAQUE PAR RPE 80
G. EVALUATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE AU NIVEAU DU TISSU CARDIAQUE 80
H. RT-PCR EN TEMPS REEL 83
I. WESTERN BLOTTING 87

J. Analyses statistiques 89

IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS 91

A. Premiere partie : Effets metaboliques de la restriction calorique chez les souris ayant subi une suralimentation postnatale 92

1. Introduction 93

2. Résultats 95

3. Discussion 102

B. Deuxieme partie : Effets cardiovasculaires de la restriction calorique chez les souris ayant subi une suralimentation postnatale 105

1. Introduction 106

2. Résultats 108

3. Discussion 116

C. Troisieme partie : Consequences mitochondriales et oxydatives cardiaques d'une suralimentation postnatale et d'une restriction calorique 119

1. Introduction 120

2. Résultats 122

3. Discussion 126

D. Quatrieme partie : Etude des consequences d'une suralimentation postnatale et d'une restriction calorique sur les voies signalisation de l'insuline et de la leptine au niveau du tissu cardiaque 128

1. Introduction 129

2. Résultats 131

3. Discussion 133

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 136

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 140

VII. ANNEXES 164

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères et seuils de diagnostic du syndrome métabolique (selon l'OMS et le NCEP ATP III).. 15
Tableau 2 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR..... 85
Tableau 3 : Taux plasmatiques de glucose, d'insuline, de leptine et l'indice HOMA-IR au sein des quatre groupes d'animaux à l'âge de 7 mois. 99
Tableau 4 : Expression génétique des enzymes antioxydantes : Catalase, MnSOD, Cu/ZnSOD. 125
Tableau 5 : Expressions génétiques d'IRS1 et de Glut4 dans les cœurs de souris NA et SA sous restriction calorique (RC). L'effet significatif a été calculé avec un test ANOVA. 131

Liste des figures

Figure 1. Prévalence de l'obésité par région et son évolution depuis 1997 11
Figure 2 Représentation schématique de la voie utilisant des acides gras libres comme substrat énergétique dans le myocarde (Lopaschuk et al. 2010). 27
Figure 3 : Schématisation du métabolisme énergétique dans le muscle cardiaque. (Foretz et al. 2006). . 28
Figure 4 : Représentation de la chaîne respiratoire 32
Figure 5 : Schéma représentant le modèle de SAPN par réduction de la taille des portées chez les rongeurs (rats et souris) et ses conséquences sur le poids corporel. 36
Figure 6 Conséquences physiopathologies de la SAPN chez les rongeurs 49
Figure 7 : Schéma montrant les effets de la RC sur le stress oxydant 67
Figure 8 : Protocoles expérimentaux des souris 74
Figure 9 : Représentation schématique de l'installation de souris pour la réalisation de l'échocardiographie. D'après Zhou YQ et al., 2004 76
Figure 10 : Protocoles expérimentaux pour l'étude de sensibilité cardiaque aux lésions d'ischémie (I)-reperfusion (R) après une période de stabilisation (S) initiale 79
Figure 11 Tracé oxygraphique. 82
Figure 12 : Evolution de la masse pondérale au cours du temps au sein des 2 groupes expérimentaux. . 95
Figure 13 : Evolution de la masse pondérale pendant la période de restriction calorique au sein des quatre groupes expérimentaux. 96
Figure 14 : Composition corporelle à l'âge de 6 mois au sein des deux groupes de souris 97
Figure 15 Composition corporelle à l'âge de 7 mois au sein des quatre groupes de souris 98
Figure 16 Evolution de glycémie et aire sous la courbe de la glycémie après injection de glucose (2 g/kg) avant (A, B) et après la RC (C, D). 100
Figure 17 : Evolution de glycémie et aire sous la courbe de la glycémie après injection de l'insuline (0,75 UI/kg) avant (A, B) et après la RC (C, D). 101
Figure 18 : Variation du rapport entre le poids des cœurs et le poids corporel des souris avant et après 4 semaines de restriction calorique au sein des quatre groupes de souris. 108
Figure 19 : Evolution des fractions d'éjection (A) et des fractions de raccourcissement (B) du ventricule gauche au sein des quatre groupes de souris avant et après 4 semaines de restriction calorique..... 109
Figure 20 : Diamètres télédiastoliques et télésystoliques au sein des 2 groupes avant RC (A) et évolution des diamètres télédiastoliques (B) et télésystoliques (C) du ventricule gauche au sein des quatre groupes de souris après 4 semaines de restriction calorique. 110
Figure 21 : Représentation de la pression développée par le ventricule gauche (A), du débit coronaire (B) et de la fréquence cardiaque (C) des cœurs isolés perfusés, après 15 minutes de perfusion au sein des quatre groupes de souris 111
Figure 22 : Récupération de la pression développée par le ventricule gauche (A) et du débit coronaire (B) des cœurs isolés perfusés, après 30 minutes d'ischémie globale totale, pendant la reperfusion. 112
Figure 23 : Evolution de la pression diastolique ventriculaire gauche au cours de la séquence ischémie (I) reperfusion (R) (30 min d'ischémie globale totale suivies de 2 heures de reperfusion) 113

Figure 24 : Evolution de dP/dt max et dP/dt min au cours de la séquence ischémie reperfusion (30 min d'ischémie globale totale suivies de 2 heures de reperfusion)..... 114
Figure 25 : Quantification par planimétrie de la taille de la zone infarcie (A) et coupes transversales marquées au TTC de cœurs (B) soumis à 30 min d'ischémie globale totale suivies de 2 heures de reperfusion. 115
Figure 26 : Respiration basale des muscles papillaires perméabilisés sans stimulation (Etat 1), après l'ajout de glutamate, malate, pyruvate (Etat 2 CI); de succinate (Etat 2 CII) ; d'ADP (Etat 3) ; et de carboxy-atractyloside (Etat 4) au sein des quatre groupes de souris. 123
Figure 27 Expression protéique des cinq complexes (CI-CV) de la chaîne respiratoire (OXPHOS) au niveau du tissu cardiaque (A). Illustration de Western blot des niveaux de complexes OXPHOS IV des protéines (B). 124
Figure 28 : Evaluation par spectroscopie de RPE du stress nitro-oxydatif tissulaire cardiaque par la production du radical CP• au sein des quatre groupes de souris. 125
Figure 29 : Expression protéique des récepteurs à l'insuline dans le tissu cardiaque au sein des quatre groupes de souris. 131
Figure 30 : Expression cardiaque de pSTAT3/STAT3 (A et B) et de pAMPK/AMPK (C et D) déterminée par Western blot. La forme phosphorylée rapportée sur la forme totale de la protéine est indicative de l'activation des protéines respectives. 132

Liste des abréviations

11β-HSD-1 : 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1

ACC: Acétyl-CoA carboxylase

AGRP : Protéine agouti

ANT : Transporteur des nucléotides adényliques

ATP : Adénosine Triphosphate

BER: Base excision repair

CART: Cacaine- and amphetamine-regulated transcript

CI : NADH déshydrogénase

CIII : Ubiquinone-cytochrome c réductase

CIV : Cytochrome c oxydase ()

CMH : 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine

CoA : Acyl-coenzyme A

Complexes II : Succinate déshydrogénase

CPT: Carnitine palmitoyltransférase

CRM : Chaine respiratoire mitochondriale

DC : débit coronaire

DOX : Doxorubicine

eNOS : enthothelial NOS

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FAS: Fatty acid synthase

FATP : Fatty Acid Transporters Protein

FC : fréquence cardiaque

FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche

FR : fraction de raccourcissement

GC: Glucocorticoïdes

GH: growth hormone

GLP1 : Glucagon-like peptide-1

GLUT : Glucose Transporter

GPX : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GSH : Glutathion

GSSG : Glutathion oxydé

GTT : Tests tolérance au glucose

HDL: High density lipoprotein

HNE : 4-hydroxy-2,3-nonénal

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance

HPA: Hypothalamic–pituitary–adrenal

HTA : Hypertension artérielle

HVG : Hypertrophie ventriculaire gauche

IDF: International Diabetes Federation

IDM : Infarctus du myocarde

IGF-1 : Insulin-like growth factor

IL-1β, 6,8,10 : Interleukine 1β, 6,8,10

IMC : Indice de masse corporelle

IRS-1 : Substrat du récepteur à l'insuline 1

IRβ : Récepteur β de l'insuline

ITT : Tests tolérance à l'insuline

JAK2: Janus kinase 2

LDH : Lactate déshydrogénase

LDL: Low density lipoprotein

LPS : Lipopolysaccharide

MC2R, MC4R : Mélanocortines de type 2, de type 4

MMP-2 : Matrice métalloprotéinase de type-2

Mn-SOD : Superoxyde dismutase de dépendante du manganèse

MPO : Myeloperoxydases

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NHANES III: Third National Health And Nutrition Examination Survey

NOS : Nitric Oxide Synthase

NPY : Neuropeptide Y

NTS : Noyau du tractus solitaire

OB-R : Récepteur de la leptine

PAI-1 :Plasminogen Activator Inhibitor 1

PCI : Pré-conditionnement ischémique

PCSK1: Pro-hormone convertase-1

PDVG : Pression développée par le ventricule gauche

PI3K: Phosphatidylinositol-3 kinase

PIP3: Phosphatidylinositol triphosphate

pol β : ADN polymérase β

POMC : Pro-opiomélanocotine

PPARγ Récepteurs activés par les prolifférateurs de peroxisomes γ

Prx3: Peroxyredoxine 3

PVN : Noyau paraventriculaire

RC : Restriction calorique

RCIU : Retard de croissance intra-utérin

RC-JI : protocole de RC associée à un jeûne intermittent

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

SAPN : Suralimentation postanatale

SIM1 : Single-minded homolog 1

SOCS3 : Suppresseur de la signalisation de cytokine

SOD : Superoxydes dismutases

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

TGFβ 1 : Transforming growth factor β 1

TNFR-1 : Récepteur 1 du Facteur de nécrose tumorale

TNFα : Tumor Necrosis Factor alpha

TTC: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

UCP : Uncoupling protein

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VMH : Noyau hypothalamique ventro-médian

αMSH : Mélanocortine

β3AR : Récepteurs β3 à l'adrénaline

ΔpH : Gradient de protons ou gradient de pH

ΔΨm : Potentiel membranaire mitochondrial

I. INTRODUCTION GENERALE

A. Surpoids, obésité et syndrome métabolique

1. Surpoids et obésité

a) Définition

Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut s'accompagner d'effets néfastes sur la santé. Actuellement l'indice le plus couramment utilisé chez l'Homme, pour évaluer la masse grasse est l'indice de masse corporelle (IMC) ou BMI (Body Mass Index). Il est basé sur le rapport poids/taille^2 (kg/m^2). Cet indice 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

Il existe également d'autres méthodes classiquement utilisées en clinique, comme 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 de la croissance, coordonnée par le Centre International de l'Enfance.

b) *Prévalence dans le monde et en France*

L'obésité concerne aujourd'hui la quasi-totalité de la planète, y compris de nombreux pays émergents. D'après les estimations mondiales récentes de l'organisation mondiale de la Santé (World Health Organization, WHA) en 2014, plus de 1,9 milliards d'adultes (personnes de 18 ans et plus) étaient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions étaient obèses. Globalement, environ 13% de la population adulte mondiale (11% des hommes et 15% des femmes) étaient obèses en 2014. 39% des adultes (38% des hommes et 40% des femmes) étaient en surpoids. La prévalence de l'obésité a plus que doublé au niveau mondial entre 1980 et 2014.

Selon la dernière enquête Obépi publiée en 2012 plus de 21 millions de Français sont en surpoids ou obèses. 32,3% des Français adultes de 18 ans et plus sont en surpoids (25 ≤ IMC <30 kg/m^2) et 15% présentent une obésité (IMC ≥ 30 kg/m^2) (Figure 1). Depuis le début de ces enquêtes réalisées tous les 3 ans depuis 1997, la hausse se poursuit mais subit une décélération par rapport aux années précédentes.

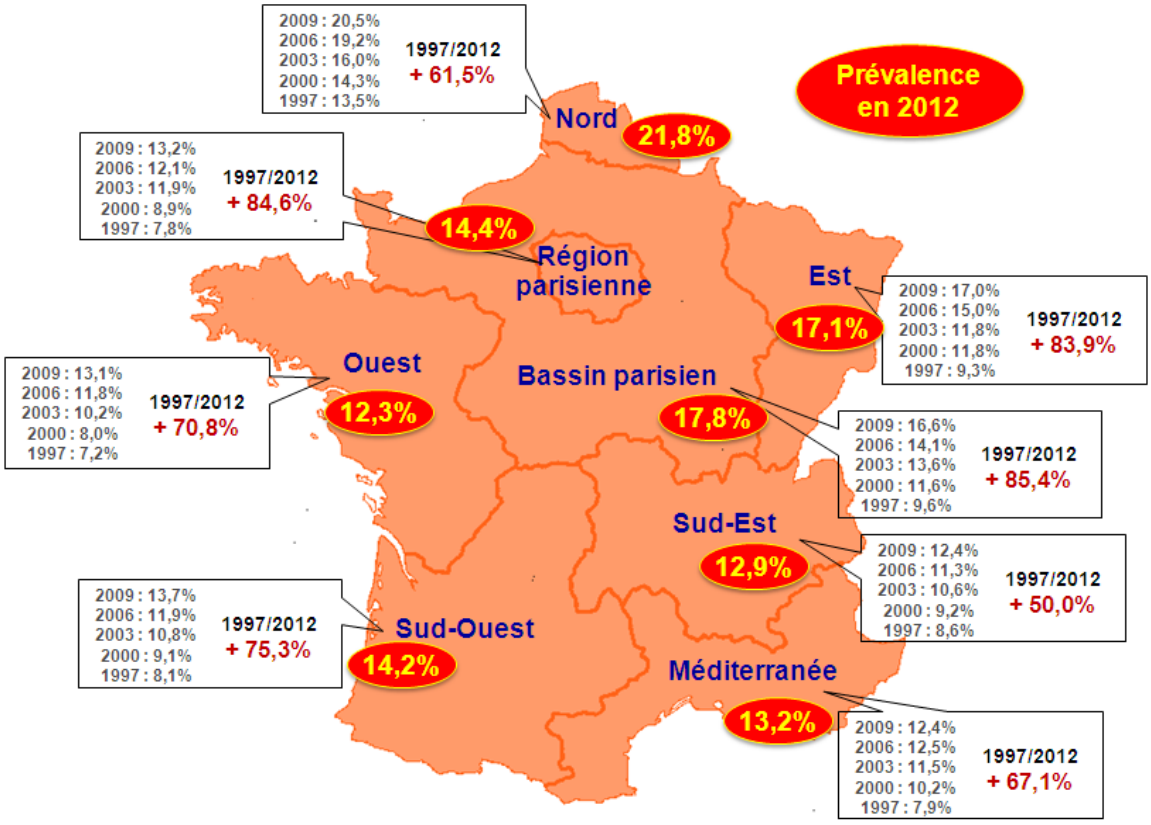

Figure 1. Prévalence de l'obésité par région et son évolution depuis 1997

c) Physiopathologies de l'obésité

L'obésité peut être considérée, dans une première approximation, comme une maladie du tissu adipeux. Dans l'organisme, on distingue deux catégories différentes de tissu adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc. 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 thermogenèse grâce à sa forte capacité d'oxydation des substrats. Le tissu adipeux blanc a pour rôle principal d'assurer le stockage sous forme de lipides et la mobilisation de l'énergie.

Ces tissus adipeux sont composés pour un tiers de cellules adipocytaires, qui sont des cellules de 30 à 100 µm de diamètre, composées pour l'essentiel d'une vacuole lipidique plus ou moins importante repoussant le noyau en périphérie de la cellule. La vacuole lipidique contient 99% de triglycérides, 0,6% de composés insaponifiables, 0,4% de cholestérol et 0,2% de phospholipides. Dans les deux tiers restants du tissu adipeux, on retrouve des cellules souches, des fibroblastes et du tissu fibreux, des lymphocytes et d'autres cellules du système immunitaire, des cellules vasculaires, des terminaisons nerveuses.

Le rôle du tissu adipeux ne se limite donc pas uniquement au stockage des graisses : il reçoit un certain nombre d'informations, en particulier en provenance du cerveau et du tube digestif mais il est aussi capable de produire de nombreuses substances de communication intercellulaires, les adipokines, qui transmettent les informations qu'il adresse au système nerveux central, au foie, aux muscles, au cœur, aux vaisseaux, à l'intestin… Parmi ces adipokines, les plus connues sont : la leptine, l'adiponectine, l'apeline, la résistine, la visfatine, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1), mais également certaines cytokines : le TNFα, IL-1β, 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 (Rajapurohitam et al. 2003) et l'adiponectine (Shibata et al. 2004, Ohashi et al. 2006) seraient particulièrement impliquées dans les dysfonctions cardiovasculaires associées au surpoids et à l'obésité.

Les mécanismes qui conduisent à l'obésité peuvent en partie trouver leur origine dans un dérèglement de certaines régulations de système nerveux central, et en particulier dans l'hypothalamus, qui peut ne plus être en mesure de freiner la prise alimentaire et d'ajuster la dépense énergétique face à un excès d'apports alimentaires et de stocks de masse grasse (Spiegelman et al. 2001). Par ailleurs, au niveau du système digestif, certaines hormones digestives (incrétines comme la ghréline, le glucagon, le GLP1, etc…) et la composition du microbiote intestinal jouent un rôle désormais établi dans les

mécanismes conduisant à la prise de poids. Concernant ce dernier point, des travaux ont permis de mettre en évidence que la qualité de la flore intestinale peut être associée à une susceptibilité plus ou moins importante à développer des maladies métaboliques liées à l'obésité (Tilg et al. 2011).

d) Causes du surpoids et de l'obésité

Les origines de l'obésité sont multiples et l'identification des facteurs impliqués dans son développement et son installation est loin d'être connue avec précision.

(1) Facteurs génétiques

Les avancées scientifiques ont permis de mieux comprendre la part imputable à la génétique dans l'augmentation de la masse adipeuse. Il est connu depuis longtemps, grâce à des études épidémiologiques, que la prévalence de l'obésité est environ 4 fois plus élevée au sein de familles d'individus obèses que dans l'ensemble de la population, ce qui met plus ou moins en évidence une part d'ordre génétique dans le développement du tissu adipeux (Bouchard 1996).

On estime à environ 300 le nombre de gènes et/ou 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 (6 cas), du récepteur de la leptine (3 cas), de la pro-opiomélanocotine (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 pratiquement aucune interaction avec l'environnement, contrairement aux cas les plus généraux correspondant à une obésité multifactorielle polygénique faisant intervenir des gènes à variants fréquents et à effets modestes.

(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 insulinorésistance. 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.

(3) Facteurs environnementaux

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 à une abondance alimentaire. En outre, le stress, la qualité du sommeil, certains médicaments, certains virus, la composition de la flore intestinale, l'exposition à des polluants sont vraisemblablement autant de facteurs à incriminer. Des expositions et des événements précoces de la vie ont manifestement leur importance, y compris ceux qui surviennent avant la naissance, et même avant la gestation (facteur génétiques). L'influence de l'alimentation maternelle sur la survenue de l'obésité chez des enfants mais aussi plus tard dans la vie est étudié à la fois chez l'Homme (Oken et al. 2007, Gillman et al. 2008) et sur des modèles expérimentaux (Armitage et al. 2004, Vickers et al. 2007, Howie et al. 2009)

Accéder à une meilleure compréhension des causes et des mécanismes biologiques conduisant à l'obésité est aujourd'hui un des grands enjeux de la Recherche. Comme toutes les maladies chroniques, l'obésité devient en effet pratiquement irréversible lorsqu'elle est installée: prévenir son développement est donc primordial si l'on veut enrayer son caractère endémique.

2. Le syndrome métabolique

L'obésité s'accompagne de troubles de la santé qui constituent des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires : diabète de type 2 (dans 80 % des cas, la maladie est associée à une obésité), hypertension artérielle, dyslipidémies, syndrome d'apnée du sommeil. Elle favorise la survenue de maladies respiratoires ainsi que de pathologies articulaires telles que l'arthrose. L'obésité est en outre associée à un risque accru de certains cancers, en particulier du cancer de l'endomètre.

a) Définition du syndrome métabolique

Qu'ils soient dus à des facteurs d'ordre génétique ou environnemental, le surpoids et l'obésité sont très souvent associés, comme nous l'avons déjà précisé, à des anomalies métaboliques telles que la dyslipidémie et l'insulinorésistance.

Le syndrome métabolique, proposé par Reaven en 1988, correspond à une relation entre le périmètre abdominal, l'intolérance au glucose, l'insulinorésistance, l'hypertriglycéridémie et l'élévation de la pression artérielle (Reaven 1988).

La définition du syndrome métabolique la plus couramment utilisée en Europe reste celle de l'IDF (International Diabetes Federation) datant de 2004 : le syndrome métabolique est défini par la présence d'au moins trois de ces cinq facteurs, avec le tour de taille comme facteur principal :

- Obésité abdominale (facteur principal) : tour de taille > 94 cm pour les hommes et 80 cm pour les femmes en Europe. Toutefois pour la population américaine, les valeurs sont plus élevées : > 102 cm pour les hommes et 88 cm pour les femmes.
- Glycémie à jeun > 5,5 mmol/l (1 g/l)
- Triglycéridémie > 1,50 g/l
- HDL cholestérol < 0,4 g/l pour l'homme et 0,5 g/l pour la femme
- Pression artérielle systolique > 130 mmHg et pression artérielle diastolique > 85 mmHg

Tableau 1 : Critères et seuils de diagnostic du syndrome métabolique (selon l'OMS et le NCEP ATP III)

	OMS (1999)	NCEP ATP III (2001)	
Facteurs de risque		**Adultes**	**Adolescents**
	Anomalies de la régulation du glucose (glycémie à jeun, intolérance au glucose ou diabète) *et/ou* Insulinorésistance associée à au moins deux des facteurs de risque suivants	Au moins 3 des facteurs de risque suivants	
Hypertension	⩾ 140/90 mmHg *ou* Traitement antihypertenseur	⩾ 130/85 mmHg *ou* Traitement antihypertenseur	⩾ 90 percentile (Âge, sexe et taille)
Dyslipidémie	TG ⩾ 1,5 g/l *et/ou* HDL-C < 0,35 g/l (H), < 0,39 g/l (F)	TG ⩾ 1,5 g/l HDL-C < 0,4 g/l (H), < 0,5 g/l (F)	TG ⩾ 1,1 g/l HDL-C ⩽ 0,4 g/l (H et F)
Obésité viscérale ou centrale	Rapport tour de taille/tour de hanche > 0,9 (H), > 0,85 (F) *et/ou* IMC > 30 kg/m2	Tour de taille > 102 cm (H), > 88 cm (F)	⩾ 90 percentile (Âge et sexe)
Autres	Vitesse excrétion albumine urinaire ⩾ 20 µg/min *ou* Rapport albumine/créatinine ⩾ 30 mg/g	Glycémie à jeun ⩾ 1,1 g/l	Glycémie à jeun ⩾ 1,1 g/l

b) *Prévalence du syndrome métabolique*

L'importante prévalence du syndrome métabolique est un phénomène mondial : en effet, il ne touche plus uniquement les pays développés, mais concerne également les pays en voie de développement. 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 entre obésité abdominale et insulinorésistance serait responsable de la mise en place d'un syndrome métabolique et favoriserait l'apparition des autres facteurs (Carr et al. 2004, Reaven 2006). 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.

c) *Tissus adipeux*

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le tissu adipeux est un organe endocrinien capable de produire de nombreuses adipokines et certaines cytokines. L'accumulation de tissu adipeux au niveau viscéral s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion de leptine, de resistine, de TNFα, d'IL6…, facteurs associés avec la résistance à l'insuline et le processus inflammatoire. Toutefois, en parallèle, cette adiposité centrale est reliée à une diminution des taux circulants d'adiponectine, une adipokine aux propriétés cardioprotectrices.

(1) Hyper-leptinémie

La leptine est une adipokine dont la fonction est de réduire l'appétit, d'augmenter la dépense énergétique et l'activité sympathique, de faciliter l'utilisation du glucose et d'améliorer la sensibilité à l'insuline (Dong et al. 2014). Elle est secrétée quasi exclusivement par l'adipocyte proportionnellement à la masse du tissu adipeux. Chez les rongeurs, le récepteur à la leptine (OB-R) présente six isoformes, d'OB-Ra à OB-Rf, qui sont liées au récepteur aux cytokine de classe I. La forme longue de ce récepteur (OB-Rb) est trouvée en grande quantité dans l'hypothalamus et induit le signal de transduction (Bouret

et al. 2004). Le rôle physiologique principal de la leptine au niveau de l'hypothalamus est de réguler la satiété et la dépense énergétique. En plus de ses effets au niveau central, le récepteur à la leptine est présent au niveau d'organes périphériques, tels que le cœur, le foie, le rein et le pancréas (Ghantous et al. 2015). Le myocarde est un des organes périphériques cibles de la leptine, le récepteur OB-Rb y est présent, et des études ont démontré un lien entre la leptine et le remodelage myocardique (Yang et al. 2007). Il y existe néanmoins une controverse vis-à-vis des effets de la leptine sur l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG), certaines études ayant montré que la leptine participait au développement de l'HVG (Rajapurohitam et al. 2003, Perego et al. 2005) alors que d'autres retrouvaient à l'inverse un rôle protecteur vis-à-vis de l'hypertrophie (Barouch et al. 2003). Indépendamment des facteurs de risque cardiovasculaire classiques, certaines études ont montré que les taux circulants de leptine pouvaient prédire l'installation potentielle d'un infarctus du myocarde (Thogersen et al. 2004). La leptine affecte également la structure vasculaire comme facteur associé à l'installation de l'hypertension (Correia et al. 2001, Bravo et al. 2006), de l'angiogenèse (Park et al. 2001) et de l'athérosclérose (Jun et al. 2012).

Le rôle de la leptine comme biomarqueur du syndrome métabolique a été étudié dans différentes populations. Quelle que soit la population étudiée, les taux élevés de leptine sont associés au syndrome métabolique, ce qui n'est pas surprenant étant donné que l'hyperleptinémie est reliée à l'obésité et à l'insulinorésistance (Ghantous et al. 2015). La leptine serait en outre un marqueur sensible pour prédire chez les enfants le syndrome métabolique et le risque cardiovasculaire (Yoshinaga et al. 2008). Chez les femmes en post-ménopause, un taux de leptine élevé est associé à un syndrome métabolique, et il existe une corrélation positive entre la leptinémie et l'obésité abdominale, ainsi que les autres composants du syndrome métabolique (Lee et al. 2012). Bien qu'il y ait quelques divergences dans la littérature quant à savoir si la leptine est associée au syndrome métabolique indépendamment de l'IMC, le consensus général est que le taux de leptine est élevé dans le syndrome métabolique chez les enfants (Moreno et al. 2002), les personnes âgées ou non (Vozarova de Courten et al. 2003, Franks et al. 2005).

(2) Hypo-adiponectinémie

L'adiponectine est une protéine de 30 kDa qui, comme la leptine, est sécrétée essentielllement par les adipocytes. 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. 2012). Il existe deux types de récepteurs à l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2. AdipoRI est ubiquitaire mais particulièrement abondant au niveau des muscles squelettiques alors qu'AdipoR2 est majoritairement exprimé dans le foie. Certaines études ont identifié la présence de ces récepteurs au niveau du tissu cardiaque (Ding et al. 2007).

Parmi ses différents effets physiologiques, l'adiponectine stimule la β-oxydation et la néoglucogenèse hépatique en acivant PPAR et AMPK (Wang et al. 2008). Son action s'étend également au système cardiovasculaire ; en effet, il a été démontré qu'elle exerçait un effet bénéfique en réduisant la pression artérielle, les dommages cardiaques et l'hypertrophie ventriculaire gauche induite par une augmentation de la post-charge (Shibata et al. 2004, Ohashi et al. 2006).

d) Dyslipidémie

Une dyslipidémie correspond à une anomalie lipidique constatée au cours d'une exploration effectuée en période de jeûne, et qui se caractérise par la présence de perturbations quantitatives et qualitatives des lipoprotéines. Ces lipoprotéines sont chargées de « transporter » les lipides dans l'organisme. Le bilan lipidique tient compte des concentrations de cholestérol total, de triglycérides, du HDL- et 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 1,5g/l

L'effet de la prise de poids sur la lipidémie se traduit par une élévation non seulement des taux de triglycérides et mais aussi 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) (Pou et al. 2007), structures quant à elles responsables du transport inverse du cholestérol des tissus vers le foie.

Le ratio cholestérol total/HDL-cholestérol apparaît comme étant un facteur prédictif robuste quant à la survenue de maladies cardiovasculaires (Kastelein et al. 2008, Di Angelantonio et al. 2009). Il

est intéressant de noter que ce rapport, également appelé indice d'athérogénicité, augmente avec l'IMC (Marsh 2003), alors que, le cholestérol total tend vers un plateau au-delà d'un IMC de 30.

A la lumière de ces résultats, l'augmentation de la masse graisseuse apparent 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).

e) Régulation du glucose

La glycémie normale à jeun, est comprise entre 3,85 à 6,05 mM (soit 0,70 à 1,10 g/l). L'organisme doit pouvoir gérer l'alternance entre les périodes d'apport alimentaire et de jeûne, et ceci s'opère principalement par les sécrétions d'insuline et de glucagon qui sont responsables du maintien de la glycémie dans des limites physiologiques normales.

L'insuline est l'hormone de la phase alimentaire, dans le sens où elle est responsable de la régulation de l'augmentation importante de la glycémie qui suit un repas. La diminution de la glycémie par l'insuline est la conséquence de l'internalisation du glucose au sein des cellules et de sa mise en stockage au niveau hépatique et musculaire sous forme de glycogène. En conditions normales, la glycémie revient à la normale au bout de 3 heures après la fin du repas.

Le glucagon est l'hormone du jeûne, responsable de la régulation de la glycémie entre deux repas. Cette stabilisation de la glycémie est la conséquence de la glycogénolyse hépatique. Le glucagon n'est pas la seule hormone à présenter une action hyperglycémiante ; ainsi, les catécholamines ou le cortisol peuvent induire une néoglucogenèse hépatique et/ou une glycogénolyse au niveau du foie ou du muscle squelettique.

L'insulinoresistance 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 l'installation d'un diabète de type II, qui se développe plus fréquemment chez les sujets en surpoids (Mokdad et al. 2000, Field et al. 2001). L'insulinorésistance se caractérise par l'instauration progressive d'une hyperglycémie, initialement associée à un hyperinsulinisme, qui permet dans un premier temps d'assurer une relative tolérance au glucose. Au cours du temps, ce mécanisme adaptatif tend à se décompenser.

f) Hypertension artérielle

La prévalence de l'hypertension artérielle (HTA) s'accroît également avec l'augmentation de la masse adipeuse (KANNEL et al. 1967, Garrison et al. 1987, Timpson et al. 2009). Plusieurs explications peuvent être avancées 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 (Kadowaki et al. 2003, Arita et al. 2012), pourrait moduler le tonus vasculaire, car l'adiponectine a la capacité de stimuler la NOS (Nitric Oxide Synthase) des cellules endothéliales, ou eNOS (enthothelial NOS), une réduction de la production de NO favorisant l'installation de l'hypertension (Wang et al. 2008). En outre, l'augmentation du tissu adipeux s'accompagne d'une augmentation de l'activité des systèmes rénine angiotensine aldostérone, système majoritairement impliqué dans la genèse de l'HTA (Umemura et al. 1997, Yasue et al. 2010).

Cette HTA, 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 prédisposant à l'insuffisance coronaire et cardiaque.

L'HTA participe au développement de l'HVG dont la prévalence est 6 fois plus élevée chez les individus en surpoids que chez les sujets normo-pondérés (de Simone et al. 2002) et qui 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 altération de la fonction cardiaque associée à une dilatation des cavités ventriculaires (Kenchaiah et al. 2002, Rider et al. 2010).

3. Conséquences cardiovasculaires de l'obésité

a) Risque cardiovasculaire

Comme nous l'avons préalablement signalé, le surpoids et l'obésité sont reconnus comme facteurs de risque impliqués dans l'initiation et le développement des pathologies cardiovasculaires. Chez les sujets obèses, le tissu adipeux joue un rôle prépondérant dans l'installation de la dysfonction endothéliale (Hutley et al. 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'accroissement de l'IMC.

Grâce à la technique d'échocardiographie, plusieurs altérations des paramètres de fonction cardiaque associées à la surcharge pondérale ont pu être évaluées. Ainsi, il a été constaté une diminution de la vitesse 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 (Rider et al. 2010, Haass 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 le degré d'étirement.

D'autres données de l'étude Framingham ont également montré que les sujets présentant un IMC supérieur à la normale avaient 45 à 50 % de risques supplémentaires de développer des arythmies cardiaques et ce, indépendamment des autres facteurs de risques cardiovasculaires (Messerli 1986, Wang et al. 2004).

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

A travers toutes ces études, il apparait clairement une implication de la surcharge pondérale dans les dysfonctions cardiovasculaires, plus ou moins fréquentes selon le degré de surpoids et d'obésité, telles que la dysfonction endothéliale, l'HTA, l'HVG, la dysfonction ventriculaire et l'insuffisance cardiaque (Wong et al. 2004). Le surpoids constitue alors l'un des facteurs de risque du développement des maladies cardiovasculaires ; de plus, la prise de poids est corrélée à une augmentation des processus oxydatifs et en particulier à une majoration du niveau du stress oxydant qui participe à l'initiation et à la progression des pathologies cardiovasculaires (Keaney et al. 2003).

b) Paradoxe de l'obésité

Bien que le surpoids ou l'obésité soient généralement considérés comme ayant des effets délétères favorisant la survenue des pathologies cardiovasculaires, quelques études démontrent à l'inverse qu'il existe un « paradoxe de l'obésité ». Par exemple, il a été montré que des patients en surpoids ou obèses atteints de pathologies cardiovasculaires présentaient un meilleur pronostic par rapport aux mêmes types de patients, mais maigres (Lavie et al. 2014). Les mécanismes de ce paradoxe sont difficiles à concilier et restent encore à explorer.

Ainsi, dans le cadre de l'hypertension artérielle, des patients hypertendus obèses peuvent présenter un meilleur pronostic par rapport à des patients hypertendus maigres (Uretsky et al. 2007). Cet effet paradoxal pourrait être lié à des résistances vasculaires systémiques moins importante et à une activité rénine plasmatique plus faible (Lavie et al. 2007).

Ce paradoxe de l'obésité existe également chez les patients atteints de coronaropathies et d'insuffisance cardiaque. Une diminution des risques de mortalité totale et cardiovasculaire a été observée chez les patients en surpoids ou obèses par rapport aux patients de poids normal et maigres pour les coronaropathies (Romero-Corral et al. 2006, Lavie et al. 2012, De Schutter et al. 2014) et pour l'insuffisance cardiaque(Oreopoulos et al. 2008).

Certains auteurs suggèrent enfin que le paradoxe de l'obésité caractériserait plus particulièrement les patients ayant une mauvaise condition physique, tandis que pour ceux présentant une meilleure forme physique et dont le pronostic est meilleur, aucun paradoxe de l'obésité n'existerait (Lavie et al. 2014).

4. Obésité infantile et ses conséquences à long terme

Comme nous l'avons initialement évoqué, si l'augmentation de la prévalence de l'obésité chez les adultes est un problème majeur de santé publique, l'augmentation de la prévalence d'obésité chez les enfants est encore plus marquée. La détermination de l'obésité chez les enfants est plus difficile à appréhender et à quantifier. La définition typique utilisée est la déviation de l'IMC selon l'âge et le sexe. L'enfant qui présente un IMC dans le 85^{e} percentile pour le groupe de son âge peut être considéré en surpoids et il est classifié comme obèse avec un IMC dans le 95^{e} percentile. Aux Etats Unis, la prévalence de l'obésité chez les enfants de 6 à 10 ans a augmenté de 4,4% à 18,2% entre les années 1970 et 2010, tandis que la prévalence de l'obésité chez les enfants de 2 à 5 ans a augmenté de 4,8% à 12,1% entre les années 1972 à 2010 (Fryar et al. 2012). Dans les pays européens, une tendance similaire d'augmentation de la prévalence du surpoids chez les enfants a été démontrée (Lobstein et al. 2005).

Il est bien démontré que l'obésité infantile est un facteur de risque d'obésité et de comorbidités chez l'adulte (Allcock et al. 2009, Park et al. 2012). Ceci peut bien entendu s'expliquer par une persistance à l'âge adulte d'une obésité déjà présente chez l'enfant, toutefois, certaines études ont précisé que le risque plus élevé de maladies coronaires, de diabète, de cancer colorectal, d'arthrite et de goutte, observé chez les individus ayant été obèses pendant l'enfance, était indépendant de la présence d'une obésité à l'âge adulte (Must et al. 1992). **L'obésité infantile constitue alors un modèle d'étude des**

conséquences métaboliques à long terme d'un surpoids présent au cours des premières étapes de la vie.

B. Physiopathologie cardiovasculaire

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

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

a) 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 différentiation des myocytes cardiaques se produit durant le dernier semestre de la gestation (Rivello et al. 2002). Cette hyperplasie fœtale est accompagnée d'une légère augmentation de volume cellulaire indiquant la coexistence de mécanismes de multiplication cellulaire et d'hypertrophie des cardiomyocytes (Burrell et al. 2003).

b) Le cœur en période postnatale

Des études récentes ont montré qu'au cours de la période néonatale, après la première semaine de vie qui suit la naissance la plupart des cardiomyocytes perdent leur capacité proliférative, si bien que le cœur continue de croître, mais selon un processus qui est majoritairement, puis exclusivement, relié à l'hypertrophie des cardiomyocytes, c'est-à-dire à une augmentation de la taille et du volume des cellule. Cette transition se fait de manière rapide, entre 3 et 4 jours après la naissance (Li et al. 1996) et est liée au processus oxydatif qui accompagne la mise en jeu des fonctions pulmonaires du nourrisson (Puente et al. 2014). 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 binuclée (Soonpaa et al. 1997) avec des proportions variables en fonction des espèces ; chez l'Homme le pourcentage de cardiomyocytes binuclés 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).

c) *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 et al. 1997). Cette capacité de prolifération des cardiomyocytes adultes reste cependant très faible et limite ainsi le cœur à récupérer ses fonctions après un infarctus.

L'augmentation de taille du cœur par hypertrophie peut être considérée comme physiologique ou compensatrice afin de faire face à une charge de travail accrue ; cependant, le prolongement de ce processus peut en être la décompensation qui conduit à des effets néfastes tels que l'insuffisance cardiaque congestive, l'arythmie et la mort subite.

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.

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 (Phelps et al. 1981, Bartelds et al. 1998). Progressivement après la naissance, le cœur effectue une transition de substrat, passant du glucose et lactate aux acides gras (Laughlin et al. 1993). 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).

a) Catabolisme des acides gras

Au niveau myocardique, les capacités de stockage des acides gras sont limitées par 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) (Figure 2). 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'acyl-CoA synthétase, enzyme située dans la membrane externe mitochondriale. Cet acyl-CoA 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 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 une β-oxydation afin de générer les molécules d'ATP. Les acides gras ne subissant pas de β-oxydation sont stockés sous forme de triglycérides constituant ainsi une réserve énergétique.

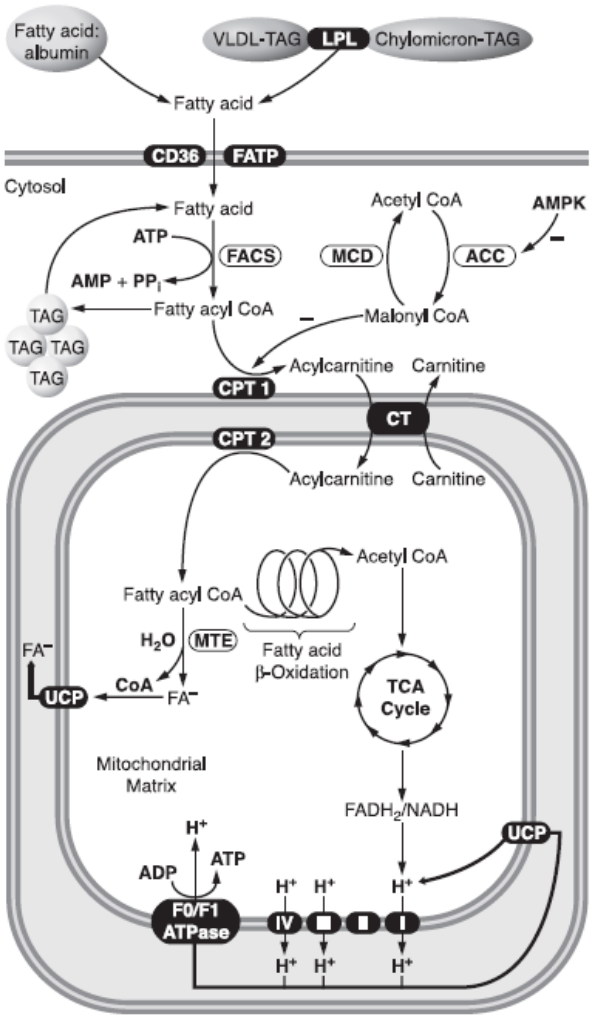

Figure 2 Représentation schématique de la voie utilisant des acides gras libres comme substrat énergétique dans le myocarde (Lopaschuk et al. 2010).

Les acides gras utilisés par le myocarde proviennent soit du plasma et sont liés à l'albumine, soit des triglycérides (TAG) des chylomicrons et des VLDL. Ils pénètrent dans la cellule par diffusion simple ou via des transporteurs CD36/FATP. Une fois dans le cytosol, les acides gras sont transformés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (FACS), puis l'acylCoA pénètre dans la mitochondrie grâce à la navette carinitine impliquant les Carnitine Palmitoyl Transférases (CPT1 et 2). La β-oxydation oxyde l'acyl-CoA en acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs. Le cycle produit les équivalents réduits (NADH et $FADH_2$), qui permettent, via la chaîne respiratoire de la membrane mitochondriale, la phosphorylation oxydative produisant l'ATP à partir d'ADP. Dans certaines conditions, la longue chaîne d'acyl-CoA peut être clivée par le thioseterase mitochondrial (MTE) en anions d'acides gras (FA^-) qui quittent la matrice mitochondriale par l'intermédiaire de la protéine découplante (UCP).

b) 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) (Figure 3). 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 et al. 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 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.

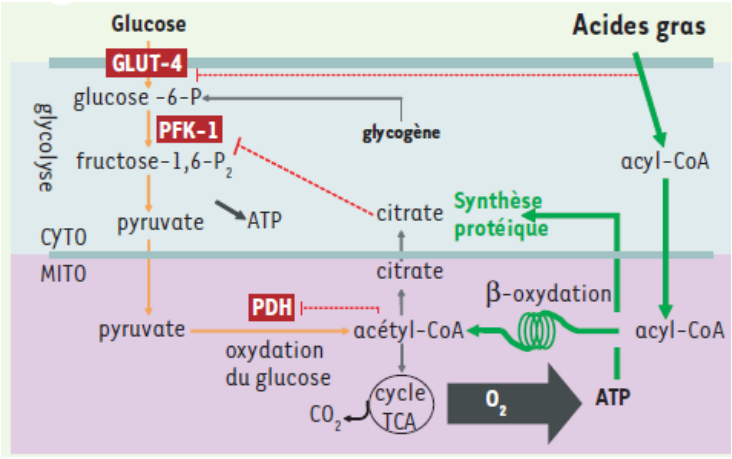

Figure 3 : Schématisation du métabolisme énergétique dans le muscle cardiaque. (Foretz et al. 2006).

La production d'ATP par le cœur sain est assurée en condition d'aérobie par l'oxydation de différents substrats comme les acides gras et le glucose, le substrat préférentiel étant les acides gras (70%). L'acide gras est transformé en acyl-CoA, puis entre dans la mitochondrie et participe ensuite la β-oxydation mitochondriale. Le glucose qui entre dans la cellule cardiaque via les transporteurs GLUT4, est transformé en pyruvate par la glycolyse. Dans la mitochondrie, la pyruvate déshydrogénase (PDH) transforme le pyruvate en acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs pour produire de l'ATP. La voie métabolique d'oxydation des acides gras inhibe celle du glucose (les lignes pointillées rouges signifient une inhibition).

c) 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, plus rentable sur le plan énergétique. Cependant, lorsqu'il y a une inadéquation entre l'apport et la consommation d'oxygène, le métabolisme énergétique est redirigé vers l'utilisation des hydrates de carbone, afin d'optimiser le rendement. Ainsi, le lactate apparait 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 ces 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. La fonction mitochondriale

Le muscle cardiaque est un organe très oxydatif puisque sa production d'énergie dépend à 95% du métabolisme oxydatif. Ainsi, le cœur, qui ne représente que 0.4% de la masse corporelle d'un individu, est responsable de 11% de la consommation totale d'oxygène (Ventura-Clapier et al. 2011). Bien qu'il y ait une production d'ATP dans le cytosol, notamment lors de la glycolyse anaérobie permettant la transformation du glucose en pyruvate (2 molécules d'ATP produites pour une molécule de glucose consommée), l'essentiel de la production énergétique a lieu dans la mitochondrie (36 molécules d'ATP produites pour une molécule de glucose consommée). Ces organites, qui jouent un rôle fondamental dans le maintien de l'homéostasie, représentent environ 30% du volume cellulaire du cardiomyocyte (Schaper et al. 1985). En raison de sa forte demande énergétique et à haute densité en mitochondries, le cœur est particulièrement vulnérable à un dysfonctionnement mitochondrial.

Lors de la glycolyse, de la β-oxydation et du cycle de Krebs, le métabolisme cellulaire produit des cofacteurs réduits comme le NADH + H^+ et le $FADH_2$ (flavine adénine dinucléotide réduit). La réoxydation de ces molécules par le transfert des électrons sur l'oxygène (accepteur final), par l'intermédiaire de la chaîne de transport d'électrons de la membrane mitochondriale interne, permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP. L'ensemble de ces réactions qui conduisent à la synthèse d'ATP consomment de l'oxygène et sont ainsi assimilées à une respiration mitochondriale (ou phosphorylation oxydative). Cette phosphorylation oxydative se décompose donc en trois étapes essentielles : la constitution d'un pool matriciel de cofacteurs réduits, le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP à proprement parler.

a) La constitution d'un pool matriciel de cofacteurs réduits

Le métabolisme oxydatif dans la mitochondrie est principalement tributaire des acides gras et du pyruvate produits par la glycolyse dans le cytosol. Ces composés sont sélectivement transportés du cytosol à la matrice mitochondriale où ils sont scindés pour former le groupement acétyle de l'acétyl CoA. Afin d'assurer un apport continu de combustible nécessaire au métabolisme oxydatif, les cellules animales stockent les acides gras sous la forme de triglycérides et le glucose sous la forme de glycogène. L'acétyl CoA va rentrer dans le cycle de Krebs pour être oxydé au niveau de son groupement acétyle. Au cours de ce cycle de Krebs, le NAD^+ et le FAD sont réduits respectivement en NADH + H^+ et $FADH_2$, les cofacteurs réduits indispensables au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

b) *Le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire*

Le transfert des électrons issus des coenzymes réduits NADH + H^+ et $FADH_2$ est réalisé par différentes réactions d'oxydoréduction au niveau de la chaîne respiratoire (Figure 4). Ce phénomène est couplé au transport actif de protons, depuis la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi une différence de potentiel électrochimique (couplage chimiosmotique).

Le NADH et le $FADH_2$ sont oxydés respectivement au niveau des complexes I (NADH déshydrogénase) et II (succinate déshydrogénase) de la chaîne respiratoire. Chacune de ces oxydations libère deux électrons qui sont transférés au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q). Ces électrons sont successivement pris en charge par le complexe III (ou ubiquinone-cytochrome c réductase), le cytochrome c et le complexe IV (ou cytochrome c oxydase). Ils réagissent enfin avec leur accepteur final, l'oxygène moléculaire, pour former des molécules d'eau. Au cours de ces étapes, une quantité très faible d'électrons est incomplètement réduite, essentiellement au niveau des complexes I et III. Ces électrons réagissent avec l'oxygène moléculaire et génèrent ainsi des espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui ont des rôles importants de second messager mais peuvent éventuellement être néfastes (voir ultérieurement). Lors de cette phosphorylation oxydative, les complexes I, III et IV utilisent l'énergie générée par ce transfert d'électrons pour pomper des protons depuis la matrice vers l'espace inter-membranaire. Ceci crée un gradient de protons (ou gradient de pH, ΔpH) et modifie le potentiel membranaire mitochondrial (ΔΨm)

c) *La synthèse d'ATP*

La génération d'ATP par la phosphorylation oxydative dépend d'un processus chimiosmotique, proposé dès 1961. Ce terme vient du fait que les intermédiaires chimiques riches en énergie sont remplacés par une association entre des processus chimiques (« chimi ») et des processus de transport (« osmotiques »). L'imperméabilité de la membrane mitochondriale permet de maintenir le gradient de protons. Le reflux de protons, dans le sens de ce gradient, est employé pour activer une enzyme membranaire, l'ATP synthase (ou F0/F1-ATP synthase), qui catalyse la conversion d'ADP + Pi en ATP, et complète le processus de la phosphorylation oxydative. C'est le domaine membranaire F0 qui joue le rôle de canal à protons alors que le domaine extrinsèque hydrophile F1, du côté matriciel, supporte l'activité catalytique de l'ATP synthase, également appelée complexe V. Son fonctionnement est néanmoins réversible, si bien que, lors d'une chute de la force protomotrice, une hydrolyse de l'ATP se produit.

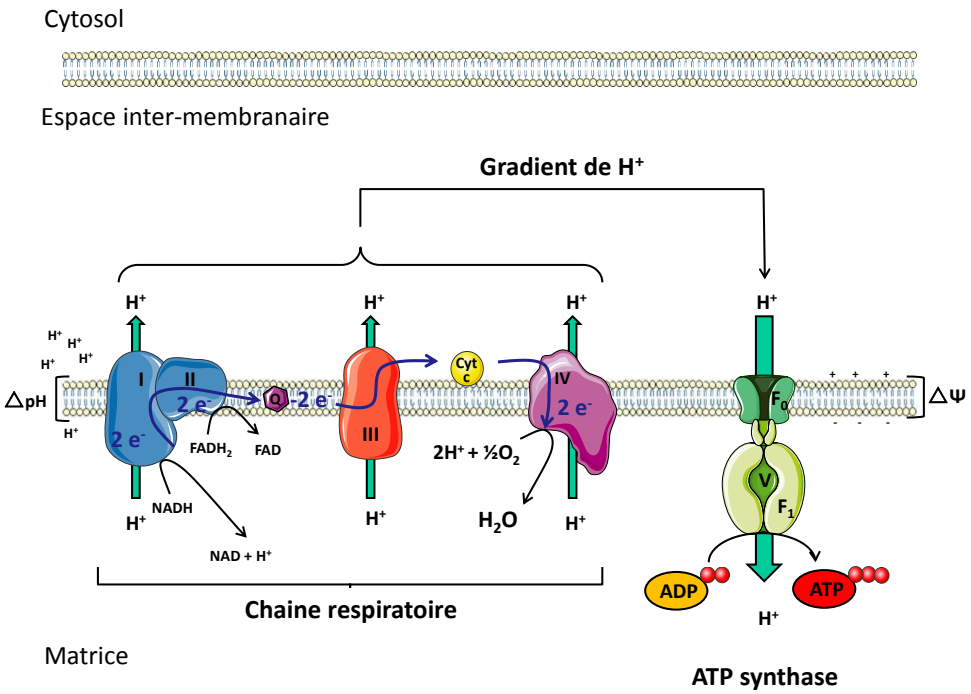

Figure 4 : Représentation de la chaîne respiratoire

Le flux d'électrons provenant des complexes I (pour le NADH) ou II (pour le FADH2) est transféré successivement à l'ubiquinone, au complexe III, au cytochrome c, au complexe IV, et finalement combiné à l'oxygène moléculaire. Les complexes I, III et IV sont également des pompes à protons qui font sortir des H+ vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient de pH (ΔpH) et un potentiel de membrane mitochondrial (ΔΨm). Le complexe V ou F0/F1-ATP synthase convertit cette force protomotrice en ATP en faisant rentrer les H+ dans la matrice.

d) Transport des nucléotides adényliques

Le bon fonctionnement de la phosphorylation oxydative est conditionné par un transport satisfaisant d'ADP et d'ATP. L'ATP est synthétisée dans la matrice mais utilisée en grande partie dans le cytosol. A l'inverse, l'ADP est synthétisée dans l'espace intermembranaire. C'est le transporteur de nucléotides adényliques (ou ANT) qui assure la continuité métabolique de ce système. Cette translocase hautement spécifique transfère une molécule d'ATP dans l'espace intermembranaire pour chaque molécule d'ADP qui rentre au niveau matriciel.

C. Programmation périnatale des maladies cardio-métaboliques

1. L'hypothèse de Barker

Il y a une vingtaine d'années, des études ont montré que l'environnement *in utero* intervenait de manière importante dans l'installation du surpoids. Des études épidémiologiques ont montré qu'une sous-nutrition au cours de la grossesse entraînait une reprogrammation du métabolisme fœtal avec une mise en place d'un retard de croissance intra-utérin mais aussi à long terme d'une insulino-resistance (Barker et al. 1990). Cette étude est à l'origine de l'hypothèse d'une « cause précoce des maladies chroniques à l'âge adulte » (Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)) proposée par Barker, démontrant qu'une sous-nutrition fœtale augmente le risque de survenue d'un surpoids associé à une incidence plus fréquente des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte (Barker et al. 1986)). Cette hypothèse fut ainsi la pierre angulaire d'autres études s'intéressant à l'impact de perturbations environnementales et nutritionnelles 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 (Pettitt et al. 1985, Silverman et al. 1995). 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 (Ong et al. 2000, Morrison et al. 2010). Expérimentalement, l'induction d'un diabète gestationnel chez la ratte s'accompagne de perturbations cardiovasculaires à long terme chez sa descendance, avec par exemple une augmentation du niveau de pression artérielle et des altérations de la réponse vasomotrice (Duong Van Huyen et al. 2010, Blondeau et al. 2011, Vessieres et al. 2016).

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 des maladies cardiovasculaires et respiratoires, d'accidents vasculaires cérébraux et du diabète de type 2 (Kuh et al. 2004, Newnham et al. 2009).

2. Programmation 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 (Dörner 1976)

Dans le même esprit, plusieurs travaux ont tenté de déterminer l'influence de l'allaitement maternel, qui induit un risque inférieur de surnutrition par rapport aux laits dits « 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 9 357 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. Les nourrissons nourris au sein, qui ont donc plus faibles apports caloriques par rapport à ceux nourris par le lait maternisé, ont moins de 40% de risque de développer un diabète de Type 2 (Owen et al. 2006). De plus, la suralimentation quantitative et qualitative associée à l'allaitement artificiel, pendant la période postnatale, comporterait des risques de dysfonctions métaboliques à plus long terme (Plagemann et al. 2012).

Afin de mieux comprendre et d'étudier l'effet d'une suralimentation postnatale, un modèle animal a été établi, reposant sur la réduction de la taille des portées juste après la naissance. Plagemann et coll. ont montré que, chez le rat, la réduction du nombre de petits à la naissance (portée de 3 à 4 ratons par mère au lieu de 12) induisait une augmentation significative du poids corporel accompagnée d'une augmentation de la consommation de nourriture (Plagemann et al. 1992). Cette suralimentation postnatale peut conduire, outre à un surpoids, à une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose, une hypertriglycéridémie et parfois à une élévation du niveau de la pression artérielle (Plagemann et al. 1999). Ainsi, plusieurs études tendent à démontrer qu'une modification de l'environnement hormonal et nutritionnel durant la période néonatale conduisait à une prédisposition vis-à-vis du développement de plusieurs maladies à l'âge adulte avec une mise en place d'un phénotype se rapprochant de la définition du syndrome métabolique (Boullu-Ciocca et al. 2005).

3. Suralimentation postnatale

a) Modèles animaux de suralimentation postnatale

G.C. Kennedy a été le premier chercheur à induire, chez les rongeurs, une suralimentation postnatale (SAPN) en réduisant la taille des portées (Kennedy 1957). La réduction des portées après la naissance diminue la compétition vis-à-vis de l'accès au lait maternel, alors que l'apport nutritionnel pour chaque petit est augmenté. Les animaux qui sont élevés dans la petite portée subissent donc une SAPN. Certaines études ont observé que chez les rats la consommation de lait dans les petites portées était augmentée (Cunha et al. 2009, Moreira et al. 2009) et que le lait était plus riche en lipides, en particulier en triglycérides (Sefcikova et al. 2011).

En raison de cette augmentation de la consommation de lait, les animaux élevés dans la petite portée présentent au moment du sevrage un surpoids, voire une obésité. Toutefois, les niveaux d'augmentation du poids corporel peuvent varier selon les souches, l'origine géographique et la taille des portées, de 10% à 56% chez les rats Wistar et Sprague-Dawley, et de près de 30% chez la souris (C57BL/6 ou Suisse). Dans la période post-sevrage, la grande majorité des études ont démontré que les rongeurs ayant subi une SAPN ont maintenu tout au long de la vie, dans une certaine proportion, leur gain de poids corporel (Habbout et al. 2012), et ce alors qu'ils recevaient une alimentation identique à celle des rats témoins (Figure 5). Cependant, cette augmentation du poids corporel n'a pas été retrouvée dans toutes les études (Balonan et al. 2000, Velkoska et al. 2008).

Les rongeurs ayant été soumis à une SAPN constituent donc un modèle intéressant pour étudier les conséquences d'un surpoids modéré à long terme. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les conséquences cardiovasculaires et métaboliques de l'obésité, de nombreux modèles expérimentaux d'obésité chez le rongeur peuvent être utilisés (Carroll et al. 2004). Certains modèles transgéniques présentent une obésité liée à une carence dans la signalisation de la leptine : soit par l'absence totale de la leptine (rat Zucker fa/fa, souris ob/ob) soit par l'absence de son récepteur (souris db/db). Ces modèles d'obésité présentent une augmentation rapide du poids corporel, et atteignent à l'âge adulte un poids trois fois supérieur à celui des témoins, ce qui correspond chez l'Homme à une obésité sévère. Leur intérêt est en outre limité car l'obésité monogénique est rare chez l'humain, et associée à des anomalies métaboliques graves, aux conséquences parfois dramatiques, sans comparaison avec les situations les plus classiques d'obésité. Une autre des méthodes fréquemment appliquées pour induire l'obésité chez le rongeur est d'utiliser des régimes enrichis en lipides ou en hydrates de carbones, qui conduisent à un gain de poids corporel rapide et important, atteignant parfois

le double du poids des contrôles. Là-aussi, cette prise de poids induite par l'alimentation correspond à une obésité très prononcée, elle ne représente donc pas les conditions d'un simple surpoids. Par conséquent, la SAPN chez les rongeurs, pour lesquels l'augmentation du poids corporel ne dépasse pas 30%, constitue un modèle pertinent d'étude des conséquences d'un surpoids modéré.

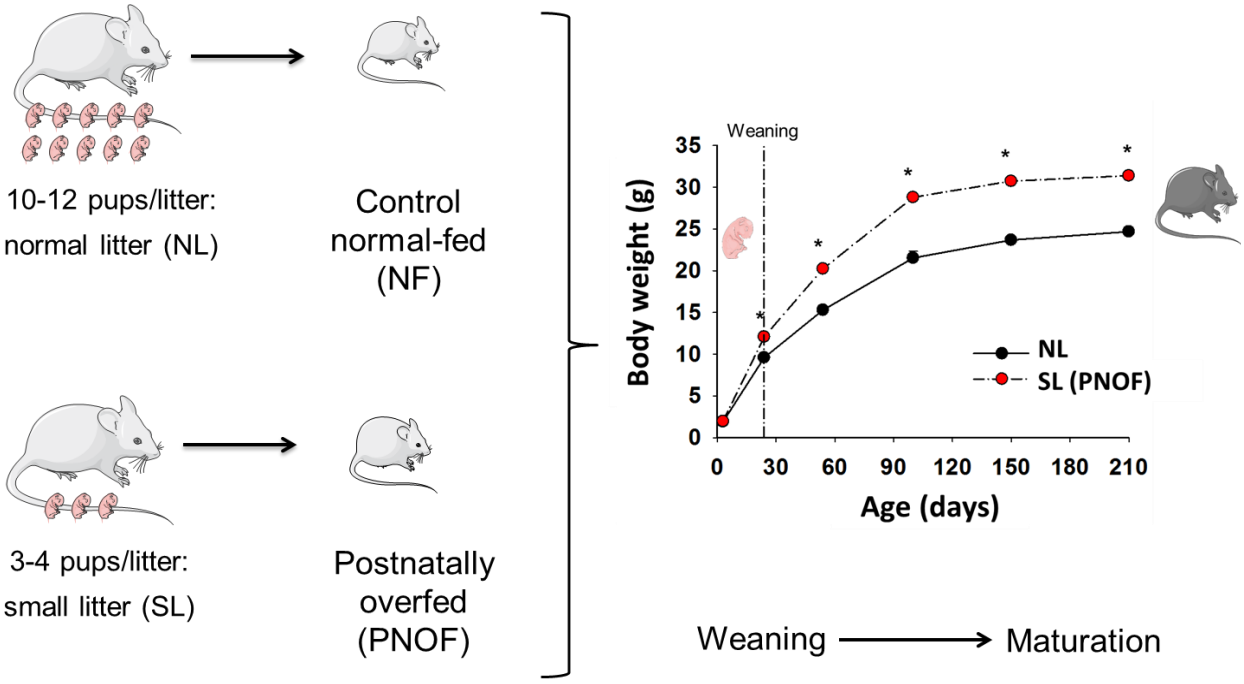

Figure 5 : Schéma représentant le modèle de SAPN par réduction de la taille des portées chez les rongeurs (rats et souris) et ses conséquences sur le poids corporel.

Les portées Témoins, constituées de 10-12 petits par mère (normoalimenté), alors que des portées de 3-4 petit par mère induits une SAPN. Une augmentation du poids corporel est observée au sevrage et se maintient tout au long de la vie (Habbout et al. 2013).

b) Hypothalamus et régulation de la prise alimentaire : modifications induites par la SAPN

L'hypothalamus, notamment l'axe noyau arqué/noyau paraventriculaire, est le centre de régulation de la prise alimentaire. Le neuropeptide Y (NPY), libéré par le noyau arqué, agit sur le noyau paraventriculaire et stimule la prise de nourriture. L'expression et la libération du NPY au sein de cet axe sont inhibées par la leptine, la ghréline et l'insuline, alors qu'une baisse de la concentration de ces hormones peut activer le système de NPY et stimuler la prise alimentaire.

Le surpoids chez les rongeurs ayant subi une SAPN semble être lié à une augmentation permanente de la consommation alimentaire (Dorner et al. 1994). Les travaux de l'équipe d'Andreas Plagemann (Plagemann et al. 1992) ont porté sur l'étude des modifications induites par la SAPN au niveau de l'hypothalamus au moment du sevrage mais aussi plus tard à l'âge adulte. Ils ont montré que le nombre de neurones exprimant le NPY dans le noyau arqué (Plagemann et al. 1999) et le nombre de neurones exprimant la galanine dans le noyau paraventriculaire (PVN) (Plagemann et al. 1999) étaient augmentés chez les rats SAPN au sevrage. A l'âge adulte, il existe également des modifications des réponses du PVN (Davidowa et al. 2002, Davidowa et al. 2003) et du noyau ventro-médian (VMH) (Heidel et al. 1999, Li et al. 2002) induites par des peptides anorexigènes (mélanocortine (αMSH), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), …) et/ou des peptides orexigènes (NPY, protéine agouti (AGRP), galanine, …). Chez les rongeurs des groupes témoins (normoalimentés), la leptine et l'insuline possèdent des actions activatrices sur VMH et des actions inhibitrices sur le noyau arqué. A l'inverse, chez les rongeurs SAPN il a été observé une action inhibitrice du VMH par la leptine et l'insuline (Davidowa et al. 2000, Davidowa et al. 2001) ainsi qu'une diminution de l'inhibition du noyau arqué par la leptine et l'insuline (Davidowa et al. 2000, Davidowa et al. 2007). Ces observations indiquent que la SAPN induit une désorganisation du système NPY dans l'hypothalamus ainsi que l'apparition d'une résistance centrale à la leptine et à l'insuline. Ces modifications au niveau hypothalamique peuvent contribuer à une hyperphagie, un surpoids et une hyperinsulinémie tout au long de la vie (Plagemann 2006). Des études épigénétiques ont montré que le promoteur du gène du peptide anorexigène POMC et celui du récepteur à l'insuline au niveau de l'hypothalamus étaient hyperméthylés chez le rat SAPN au sevrage (Plagemann et al. 2009, Plagemann et al. 2010). Les modifications épigénétiques persistent à l'âge adulte (Li et al. 2013). Ces études suggèrent que cette programmation hypothalamique pourrait être médiée, au moins en partie, par des mécanismes épigénétiques (hyperméthylation) de certains gènes de la régulation de la satiété.

c) SAPN, axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et glucocorticoïdes

Des données expérimentales et cliniques suggèrent que les glucocorticoïdes (GC) sont impliqués dans la physiopathologie de l'obésité abdominale et ses complications. En effet, un excès de GC, lorsqu'il est associé à l'hyperinsulinisme, favorise l'augmentation de la lipogenèse et une diminution de la lipolyse, ainsi qu'une stimulation de la néoglucogenèse hépatique et une inhibition de l'utilisation périphérique du glucose.

Les changements dans la signalisation des GC ont été décrits chez l'individu obèse et dans des modèles murins d'obésité. Chez les jeunes rats, la SAPN induit une maturation accélérée de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), ainsi qu'une augmentation de son activation lors d'un stress immun induit par l'administration de lipopolysaccharide (LPS) (Clarke et al. 2012). De plus, une étude récente a montré des modifications d'expression des récepteurs aux mélanocortines (MC2R) au niveau de la glande surrénale lors de l'administration d'une dose de charge de LPS (Cai et al. 2016). Dans le tissu adipeux, une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur aux GC est observée chez les animaux SAPN (Boullu-Ciocca et al. 2005). À l'âge adulte, les rats SAPN présentent une sécrétion élevée de corticostérone à la fois en condition basale et en situation de stress comparée par rapport à des rats contrôles (Boullu-Ciocca et al. 2005). Des modifications de la signalisation des GC dans le tissu adipeux viscéral ont aussi été montrées chez ces rats, avec une augmentation de l'expression génique des récepteurs aux GC et de la 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11β-HSD-1) (Boullu-Ciocca et al. 2008, Boullu-Ciocca et al. 2015). La 11β-HSD-1 est une enzyme responsable de la conversion de GC inactifs (cortisone) en GC actifs (cortisol) (Velkoska et al. 2005). Son élévation augmente donc l'activité des GC au niveau du tissu adipeux. Ainsi, il est fortement suggéré qu'une altération de l'axe HPA peut être induite par des modifications précoces de l'environnement nutritionnel et qu'à son tour, cette hyperactivité permanente du système HPA et GC peut jouer un rôle central dans le développement ultérieur de troubles métaboliques à l'âge adulte. Un travail récent a montré que la Pioglitazone, un agoniste des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes γ (PPARγ), peut normaliser la surexpression des récepteurs aux GC et de la 11β-HSD-1 induite par la SAPN au niveau du tissu adipeux et normaliser les altérations métaboliques (élévation des taux circulants d'insuline et d'acides gras) induites par la SAPN (Boullu-Ciocca et al. 2015).

Dans le foie, l'activité et l'expression de la 11β-HSD-1 est également augmentée de manière permanente chez les rats élevés dans de petites portées (Hou et al. 2011). En outre, au niveau hépatique, les expressions géniques des enzymes qui régulent le catabolisme des GC, les 5α-réductase de type 1 et

5β-réductase, augmentent de manière transitoire jusqu'à la puberté, puis diminuent à un niveau identique à celui les rats témoins. Ces modifications du métabolisme des GC pourraient contribuer à l'augmentation de l'exposition de tissus comme le tissu adipeux ou le foie aux GC et aggraver le développement de troubles métaboliques à l'âge adulte, et qui incluent une résistance à l'insuline, une dyslipidémie et une stéatose hépatique.

d) SAPN et modifications au niveau des tissus adipeux blanc et brun

Les rongeurs ayant subi une SAPN présentent une augmentation permanente du poids corporel associée à une augmentation de l'adiposité. Dans notre équipe, nous avons constaté chez les souris C57BL/6 une augmentation significative de la masse grasse (+47%) à l'âge adulte (Habbout et al. 2012).

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. Le rôle principal du tissu adipeux blanc est d'assurer le stockage et la mobilisation de l'énergie. Une augmentation du tissu adipeux blanc viscéral est observée au moment du sevrage et plus tard chez les rats (Balonan et al. 2000, Velkoska et al. 2008, Cunha et al. 2009, Rodrigues et al. 2011) et les souris ayant subi une SAPN (Glavas et al. 2010, Vieira et al. 2015, Bernardo et al. 2016). Cette augmentation du tissu adipeux blanc viscéral est associée à une augmentation de la surface des adipocytes (Boullu-Ciocca et al. 2005, Boullu-Ciocca et al. 2008, Hou et al. 2011, Conceicao et al. 2015). Il existe en outre un développement plus important du tissu adipeux blanc sous-cutané chez les souris SAPN, plus marqué chez les souris jeunes que chez les adultes (Rodrigues et al. 2011), ce qui indique qu'à l'âge adulte, l'augmentation du poids corporel et de la masse grasse sont principalement dues à un accroissement de la masse grasse viscérale. Cette adiposité ne semble pas être liée à la diminution des dépenses énergétiques (Wiedmer et al. 2002), mais semble plutôt être associée à une augmentation des enzymes qui participent ou régulent les activités de lipogenèse dans le tissu adipeux, telles que l'acide gras synthase (fatty acid synthase : FAS) qui est une enzyme catalysant la synthèse *de novo* d'acides gras et l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) qui intervient dans la première étape de la synthèse des acides gras (Balonan et al. 2000, Liu et al. 2013, Conceicao et al. 2015). De plus, une diminution de l'expression des récepteurs β3 à l'adrénaline (β3AR) est observée chez les rats au sevrage, ce qui suggère une diminution de la sensibilité du tissu adipeux blanc aux catécholamines, et conduit à une diminution de l'activité de lipolyse (Conceicao et al. 2015).

Dans les adipocytes isolés du tissu adipeux blanc de rat ayant été soumis à une SAPN, il existe une réduction de l'entrée du glucose induite par l'insuline, associée à une diminution de l'expression des

transporteurs au glucose GLUT-4 et GLUT-1. Une diminution de la voie signalisation de l'insuline est aussi observée, impliquant par exemple le substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS-1), la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et l'activité de la PKB/Akt (protéine kinase B qui phosphoryle les résidus sérine) (Rodrigues et al. 2007, Bei et al. 2015). En outre, une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'interleukine (IL-6), du facteur de nécrose tumorale-α (TNFα), du récepteur 1 du TNF (TNFR-1), de la résistine et de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) est observée chez les rats (Boullu-Ciocca et al. 2008) ou les souris SAPN (Liu et al. 2013), révélateur d'un état pro-inflammatoire du tissu adipeux blanc. L'administration de la pioglitazone à l'âge adulte (9 mois) pendant 6 semaines diminue l'expression de tous ces facteurs inflammatoires dans le tissu adipeux mésentérique de rats SAPN (Boullu-Ciocca et al. 2015).

Chez les rongeurs, le tissu adipeux brun, qui présente un rôle majeur dans la thermogenèse, est aussi impliqué dans la régulation du poids corporel. Les adipocytes bruns contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques, un grand nombre de mitochondries, une innervation sympathique dense et d'abondants thermogénines (uncoupling protein 1 : UCP1). Les rats SAPN présentent une diminution de l'ARNm d'UCP1 associée à une réduction de l'activité thermogénique au moment du sevrage et à l'âge de 4 mois (Velkoska et al. 2005, Xiao et al. 2007). A 6 mois, les souris SAPN présentent elles-aussi une diminution de l'ARNm d'UCP1 dans le tissu adipeux brun (Glavas et al. 2010). Lorsque les rats SAPN sont exposés au froid, l'activité de leur tissu adipeux brun et leur réactivité thermogénique sont réduites. Au niveau moléculaire, l'expression de plusieurs régulateurs transcriptionnels (PPARγ, C/EBP-1) et des lipases est réduite dans le tissu adipeux brun. Une diminution de l'expression des récepteurs β3AR et de la réponse à un agoniste bêta-adrénergique (isoprénaline) est observée également chez ces rats. Des études cliniques et expérimentales montrent une liaison entre l'activité d'UCP-1, la réponse du récepteur β3AR dans le tissu adipeux brun et le métabolisme chez les individus. Le dérèglement de cette voie pourrait être impliqué dans le développement du surpoids et de l'obésité.

e) Modifications des adipocytokines induites par la SAPN

Comme nous l'avons rappelé précédemment, l'adiposité centrale est un facteur de risque connu des maladies cardiovasculaires et peut présenter un impact délétère sur la survie des patients coronariens (Coutinho et al. 2011). En effet, le tissu adipeux est capable de sécréter une grande variété de peptides, est adipokines ou adipocytokines. Elles agissent comme molécules de signalisation, de manière endocrine, paracrine ou autocrine, et elles influencent de nombreuses fonctions biologiques. Certaines de ces cytokines participent de manière significative du développement des pathologies cardiovasculaires (Smith et al. 2011).

La leptine, comme nous l'avons précisé, est produite principalement par le tissu adipeux blanc et ses niveaux circulants sont proportionnels à la quantité de masse grasse corporelle. Elle joue un rôle important dans la régulation de l'appétit et de l'équilibre énergétique, mais elle est aussi impliquée dans des processus de régulation du système cardio-vasculaire. L'augmentation de la leptine chez les rats SAPN (Boullu-Ciocca et al. 2005, Lopez et al. 2005, Velkoska et al. 2005, Pereira et al. 2006, Velkoska et al. 2008, Cunha et al. 2009, Rodrigues et al. 2011, Habbout et al. 2012) ou les souris SAPN (Kappeler et al. 2009, Ye et al. 2012, Habbout et al. 2013) est retrouvée de manière constante et quel que soit l'âge de l'animal ; une donnée qui peut s'expliquer par le fait que les taux de leptine sont liés à la quantité de la masse grasse.

Bien que les taux circulants de leptine soient augmentés chez des rongeurs SAPN, des études chez le rat ont montré que ces animaux présentent une résistance centrale à la leptine, en raison d'une baisse d'expression de son récepteur de type B (isoforme longue) (OB-Rb) au niveau de l'hypothalamus (Schmidt et al. 2001, Lopez et al. 2005, Rajia et al. 2010). La cascade de la voie signalisation de la leptine implique la PI3K, la Janus kinase 2 (JAK2) et le STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3). L'activation de la voie JAK2/STAT3 stimule la transcription des gènes de la POMC (anorexigène), mais aussi du suppresseur de la signalisation de cytokine (SOCS3) qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation de la leptine. Dans l'hypothalamus des rats SAPN, une diminution d'expression de JAK2, de STAT3 phosphorylé et une augmentation d'expression de SOCS3 ont été observées, ce qui indique une résistance centrale à la leptine (Rodrigues et al. 2011). Plusieurs études ont suggéré qu'une hyperleptinémie pendant des périodes critiques du développement peut induire une mal-programmation de l'homéostasie énergétique. En fait, la leptine joue un rôle important sur le développement de l'hypothalamus pendant la période postnatale et son effet inhibiteur sur la prise alimentaire ne commence à s'exercer qu'à la quatrième semaine après la naissance (Vickers et al. 2012).

Les études électrophysiologiques ont montré, chez les rats SAPN jeunes, une diminution de l'inhibition de l'activité du noyau arqué induite par la leptine (Davidowa et al. 2000). Glavas *et al*. ont montré chez des souris Swiss Webster que cette résistance à la leptine persiste à l'âge adulte, même si ces souris ont reçu par la suite un régime alimentaire normal (Glavas et al. 2010). En outre, d'autres facteurs associés, telle que l'hyperinsulinémie, semblent jouer aussi un rôle dans le développement de la résistance à la leptine et du surpoids chez le rat SAPN (Schmidt et al. 2001).

En ce qui concerne l'adiponectine, dont la production est inversement proportionnelle à la masse grasse, les résultats sont moins consensuels. Des études chez le rat n'ont montré aucune différence entre le groupe SAPN et le groupe contrôle à 4 et 6 mois (Velkoska et al. 2005, Rodrigues et al. 2011). Toutefois, l'équipe de Boullu-Ciocca a observé une diminution des taux circulants et de l'expression de l'ARNm de l'adiponectine dans le tissu adipeux de rats SAPN de 5 mois (Boullu-Ciocca et al. 2008). Dans notre équipe, nous avons constaté une diminution de l'adiponectine chez les rats SAPN de 8 mois (Habbout et al. 2012). Cette diminution de l'adiponectine aurait des effets délétères puisqu'il est montré qu'elle améliore la sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques (Matsuzawa 2006) et induit des effets cardioprotecteurs (Gualillo et al. 2007).

f) Influence de la SAPN sur la fonction hépatique et l'homéostasie glucose/insuline

De nombreuses études ont souligné les effets d'une SAPN sur l'équilibre glucose/insuline. En effet, une augmentation de la glycémie et de l'insulinémie à jeun et une dérégulation de l'homéostasie glucose/insuline sont souvent rapportées chez les rats ou souris SAPN (Plagemann et al. 1999) (Balonan et al. 2000, Boullu-Ciocca et al. 2005, Boullu-Ciocca et al. 2008, Cunha et al. 2009, Kappeler et al. 2009, Habbout et al. 2012).

Les tests de tolérance au glucose ont suggéré que la réponse au glucose du pancréas est réduite chez les rats (Plagemann et al. 1999, Balonan et al. 2000, Boullu-Ciocca et al. 2008, Cunha et al. 2009, Hou et al. 2011) et chez les souris SAPN (Kappeler et al. 2009). Le déséquilibre glucose/insuline semble être plus important au moment du sevrage (Pereira et al. 2006), mais semble se rétablir ou même se normaliser avec la maturité (Balonan et al. 2000, Waterland et al. 2002, Rodrigues et al. 2011). A *contrario*, certaines études n'ont constaté aucune différence de glycémie ou d'insulinémie chez les rongeurs SAPN (Lopez et al. 2005, Rodrigues et al. 2007, Xiao et al. 2007, Velkoska et al. 2008, Glavas et al. 2010, Rajia et al. 2010). Il existerait en outre des différences liées au sexe car, alors que la réduction de la portée induirait une hypo-réactivité significative à l'insuline chez les rats mâles, les rats femelles SAPN y seraient insensibles (Bassett et al. 1988).

Des travaux ont montré une diminution de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans de rats SAPN soumis au glucose (Waterland et al. 2002). En fait, la sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots pancréatiques dépend essentiellement de l'entrée du glucose, qui est réalisée par le transporteur de glucose GLUT-2. Paradoxalement, une augmentation de l'expression de GLUT-2 dans les îlots pancréatiques a été observée chez les rats SAPN (Cunha et al. 2009). Waterland *et al*. ont utilisé des puces à ADN afin d'identifier les différences d'expression géniques d'îlots pancréatiques et ont mis en lumière une différence d'expression de 13 gènes au sevrage et de 10 gènes jusqu'à 4 mois (Waterland et al. 2002). Ces données indiquent que la SAPN peut modifier de façon permanente l'expression des gènes pancréatiques, vraisemblablement par des modifications d'ordre épigénétiques.

Des études réalisées sur le foie de rats SAPN ont montré une augmentation des taux hépatiques de triglycérides et des enzymes PPARα et PGC1 au sevrage, suggérant une préférence d'utilisation des acides gras comme la source énergétique dans le foie, ce qui contribuerait au développement d'une résistance à l'insuline (Conceicao et al. 2015). A l'âge de 6 mois, une diminution de la signalisation insulinique hépatique a été observée : l'expression du récepteur β à l'insuline (IRβ), de l'IRS-1, de l'IRS1 phosphorylé, d'Akt1 et de la PI3-K étaient diminuée de manière significative. Cette détérioration de la signalisation insulinique hépatique pourrait alors renforcer le déséquilibre du glucose/insuline. De surcroît, la SAPN induit une diminution des activités de plusieurs enzymes antioxydantes hépatiques, comme les catalases, les SODs et la glutathion peroxydase alors que des marqueurs du stress nitro-oxydant, tels que les nitrates et les malonedialdéhydes, sont augmentés dans le foie et le plasma (Conceicao et al. 2013). Ce déséquilibre peut être induit soit par une diminution des défenses antioxydantes, soit par une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, et pourrait également participer au développement d'une résistance à l'insuline.

Au niveau des muscles squelettiques, une hyperméthylation est observée au niveau des promoteurs des IRS1 et Glut4 chez les rats SAPN au sevrage, ce qui conduit à une diminution des ARNm de l'IRS et de Glut4. Ces modifications épigénétiques précoces altèrent la signalisation insulinique et contribuent également au développement d'une résistance à l'insuline chez ces animaux (Liu et al. 2013, Bei et al. 2015).

g) Modifications des lipides plasmatiques circulantes par la SAPN

Des perturbations des lipides plasmatiques sont souvent observées chez les rats ou souris SAPN avec une augmentation des triglycérides (Plagemann et al. 1999, Boullu-Ciocca et al. 2005, Kappeler et al. 2009, Moreira et al. 2009, Bei et al. 2015, Bernardo et al. 2016), des acides gras libres (Boullu-Ciocca et al.

2005, Boullu-Ciocca et al. 2008, Kappeler et al. 2009), du cholestérol total (Boullu-Ciocca et al. 2005, Kappeler et al. 2009, Moreira et al. 2009) et une diminution des HDL (Rodrigues et al. 2011). Toutefois, selon la souche, la taille de la portée, l'âge et l'origine géographique de l'animal, ces perturbations lipidiques ne sont pas systématiquement rapportées (Rajia et al. 2010, Hou et al. 2011) (Rodrigues et al. 2007, Xiao et al. 2007, Ji et al. 2014).

h) Fonction cardiovasculaire

(1) Pression artérielle

L'hypertension artérielle est considérée comme un facteur de risque majeur pour certaines pathologies cardiovasculaires, notamment pour l'accident vasculaire cérébral, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque. Chez les rongeurs, l'obésité induite par un régime riche en graisses est associée à une augmentation de la pression artérielle (Velkoska et al. 2005). Chez les rongeurs SAPN adultes, une augmentation de la pression artérielle systolique et diastolique a été observée (Plagemann et al. 1999, Boubred et al. 2007, Boubred et al. 2009, Kappeler et al. 2009, Habbout et al. 2012, Achard et al. 2015), mais cette augmentation est généralement mineure, de 10 à 15 mmHg, et parfois non significative (Velkoska et al. 2005, Velkoska et al. 2008, Rajia et al. 2010, Alcazar et al. 2012, Yim et al. 2012). Plusieurs médiateurs centraux et périphériques, qui sont modifiés par SAPN, peuvent contribuer à l'augmentation de la pression artérielle, tels que les glucocorticoïdes, la leptine et le neuropeptide Y. En effet, de par son effet activateur sur le système nerveux sympathique, la leptine est susceptible d'induire une augmentation de la pression artérielle (Dunbar et al. 1999). A l'inverse, le NPY, impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire, dont la libération est inhibée par la leptine, peut agir au noyau du tractus solitaire (NTS), pour induire une diminution de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Michel et al. 1995). Cependant, les mécanismes exacts impliqués dans l'induction d'une l'hypertension par le surpoids chez le rongeur ne sont pas encore élucidés. Notre équipe a été évaluée la réactivité aortique et coronaire, sur des aortes thoraciques et des cœurs isolés perfusés prélevés chez des rats Wistar SAPN. Il n'a pas été constaté de différences entre les groupes au niveau de la vasoréactivité dépendante (perfusion de bradykinine) ou indépendante (perfusion de nitroprussiate de sodium) de l'endothélium. Dans une étude récente réalisée chez des hamsters dorés, la fonction microvasculaire dépendante de l'endothélium a été évaluée par l'acétylcholine dans le muscle crémaster ; cette étude a montré qu'à l'âge adulte la SAPN induisait une dysfonction microvasculaire dépendante de l'endothélium (Leite et al. 2012).

(2) Hypertrophie et fonction myocardique

Chez le rat Wistar, la SAPN peut induire une hypertrophie cardiaque au moment du sevrage, avec une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire, un raccourcissement du diamètre du ventricule gauche, un élargissement de la surface des cardiomyocytes et une diminution de la densité des vaisseaux coronaires (Moreira et al. 2009). Si cette situation n'est pas compensée, elle peut conduire à une atteinte de la fonction contractile myocardique. Plusieurs facteurs, tels que l'étirement biomécanique ou des facteurs neurohumoraux, peuvent induire un remodelage ventriculaire. En effet, l'hypertrophie des cardiomyocytes peut être déclenchée par des hormones, des cytokines, et des facteurs de croissance. La leptine et l'insuline peuvent être considérées comme des facteurs métaboliques ou de croissance pour le cœur (Belke et al. 2002, Xu et al. 2004). Par exemple, dans les cardiomyocytes, l'insuline agit sur son récepteur (IR) puis recrute différents substrats dont l'IRS, ce qui va déclencher la phosphorylation de PI3K, augmenter le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) et activer les sérine/thréonine kinases dépendantes du PIP3. Les récepteurs de la leptine (Ob-Rb) sont également présents dans le cœur. Comme nous l'avons déjà évoqu é, la voie de signalisation de la leptine implique la PI3K, JAK2 et STAT3. Il a été montré une activation des voies de signalisation de l'insuline et de la leptine avec une augmentation de la quantité d'IR, d'Ob-Rb, de PI3K, de STAT3 et de la translocation membranaire de GLUT4 au moment du sevrage chez les rats SAPN (Pereira et al. 2006).). Cette augmentation de la sensibilité à l'insuline et à la leptine chez les jeunes rats SAPN pourrait induire une réponse adaptative cardiaque, avec une meilleure absorption du glucose et une meilleure fourniture d'énergie, mais peuvent aussi conduire à un phénotype hypertrophique.

Notre équipe a observé que la SAPN conduit à des modifications des paramètres cardiovasculaires basaux chez la souris adulte. Il s'agit notamment d'un élargissement du diamètre ventriculaire et d'une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche à 7 mois (Habbout (Habbout et al. 2013)A et al., 2013).

(3) Fibrose

Le dépôt de collagène est utilisé couramment pour déterminer la fibrose cardiaque. Plusieurs équipes ont montré une augmentation du collagène dans le ventricule gauche chez des rats SAPN adulte de 4 mois (Velkoska et al. 2008) et de 6 mois (Habbout et al. 2012). Au niveau histologique, on observe une augmentation de la densité de collagène (+54%) dans les ventricules gauche et droit de rats et souris adultes SAPN. De plus, les travaux de notre équipe ont montré une augmentation de l'expression de la

métalloprotéinase de matrice de type-2 (MMP-2) et de l'activité de la MMP-2 dans les deux ventricules chez les souris SAPN. Ces modifications touchant le collagène et la matrice extracellulaire peuvent conduire à des modifications de la structure architecturale du cœur (Habbout et al. 2013).

Plusieurs facteurs environnementaux tels que le stress oxydant ou l'augmentation de la leptine pourraient être impliqués dans ce remodelage. Certaines études ont mis en évidence le rôle de la leptine et de l'insuline dans l'allongement des cardiomyocytes (Abe et al. 2007), au cours de l'hypertrophie ventriculaire (Fredersdorf et al. 2004, Perego et al. 2005), et dans l'insuffisance cardiaque (Schulze et al. 2003). Ces changements de l'organisation myocardique pourraient être une des conséquences tardives de modifications précoces de l'expression génique de certaines isoformes de l'actine, de la myosine, du collagène, de la dystrophine et d'autres protéines structurelles que nous avons retrouvées dans nos travaux (Habbout et al. 2013), et qui pourraient avoir un impact décisif sur la structure de l'organe à long terme.

(4) Gènes cardiaques

Grace à l'utilisation de puces d'expression pangénomiques, notre équipe a montré que la SAPN peut influencer l'expression cardiaque de plusieurs gènes impliqués dans l'organisation structurelle du cœur (collagènes, myosine, actine, dystrophine, dynéine ...), le métabolisme (insuline, facteurs de croissance), la vasoréactivité (endothéline1 et son récepteur), la signalisation cellulaire et le stress oxydatif (glutathion S-transférase) (Habbout et al. 2013). Après seulement 24 jours de consommation accrue de lait maternel, l'expression génique myocardique est modifiée chez les souris SAPN, ce qui pourrait avoir un impact permanent dans la structure du cytosquelette et dans l'organisation structurelle des cardiomyocytes.

(5) Sensibilité myocardique aux lésions d'ischémie reperfusion

L'ischémie myocardique correspond à une situation d'apport limité en oxygène et en nutriments pour le cœur, et qui peut conduire à des lésions irréversibles. La reperfusion rapide du myocarde ischémique est le seul moyen permettant de sauver du tissu en souffrance, de réduire la mortalité cellulaire et de limiter la taille de l'infarctus. Paradoxalement, le retour du flux sanguin dans le territoire ischémique peut également entrainer des dommages et complications cardiaques, communément regroupés sous le terme de lésions de reperfusion.

Sur des cœurs isolés de souris ou de rats SAPN, les fonctions cardiaques basales ne sont pas modifiées par rapport à celles des cœurs des animaux contrôles. Cependant, après 30 min d'ischémie suivie de 2 h de reperfusion, la récupération du débit cardiaque est altérée pour les cœurs des rongeurs SAPN. La quantité totale de LDH, marqueur de lésions cellulaires, dans les effluents coronaire au cours de la reperfusion, est augmentée chez les rats SAPN (Habbout et al. 2012). Sur les cœurs des souris SAPN, la récupération du flux coronaire et de la contractilité est également affectée après l'ischémie. L'évaluation de la zone infarcie au bout de 2 heures de reperfusion a montré une augmentation (+ 74%) de la taille de l'infarctus sur les cœurs des souris SAPN (Habbout et al. 2013). Ces résultats suggèrent que la SAPN induit une plus grande sensibilité myocardique aux lésions d'ischémie-reperfusion avec des dommages cellulaires plus graves. Notre hypothèse est que, dans des conditions de stress, telles que celles initiées par l'ischémie-reperfusion qui génère une libération importantes d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Vergely et al. 1998, Vergely et al. 2001), les altérations métaboliques induites par SAPN, qui sont assez bénignes dans des conditions normales, favorisent une plus grande susceptibilité du myocarde aux lésions d'ischémie et/ou de reperfusion.

(6) Sensibilité cardiaque à la toxicité induite par la doxorubicine

La doxorubicine (DOX), une anthracycline couramment utilisée dans le traitement de différents types de cancers, est connue pour induire une cardiotoxicité grave et parfois létale. En effet, la DOX peut conduire à une insuffisance cardiaque congestive dose-dépendante. Le stress oxydant est un des mécanismes importants de la cardiotoxicité de la DOX, liée à la production d'ERO au cours du métabolisme intracellulaire de la quinone.

Les résultats de notre équipe ont montré que les souris qui ont subi une SAPN sont plus sensibles à la cardiotoxicité induite par la DOX, et présentent des détériorations plus graves de la fonction ventriculaire gauche, avec un élargissement plus important des diamètres ventriculaires et une augmentation des marqueurs du stress oxydatif dans le tissu cardiaque (Guenancia et al. 2015). Cette étude confirme l'idée que les cœurs des souris SAPN adultes sont plus sensibles à des lésions pathologiques induites par un stress oxydant.

i) Stress nitro-oxydant

L'obésité et le surpoids sont associés à une augmentation du stress oxydant, non seulement au niveau circulant, mais également dans le tissu myocardique (Laight et al. 1999, Vincent et al. 1999).

Notre équipe a montré une augmentation des taux d'hydroperoxydes plasmatiques et une diminution du taux de vitamine C sanguin, ce qui indique la présence d'un stress oxydant circulant chez les rats SAPN (Habbout et al. 2012). Des travaux conduits chez la souris, ont confirmé ces résultats (Habbout et al. 2013). La SAPN induit également une augmentation du stress oxydant dans le tissu myocardique à l'âge d'adulte, observé par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) (Oudot et al. 2006, Delemasure et al. 2007). Cette de la production d'espèces réactives dans le tissu myocardique chez les souris SAPN est une découverte originale qui confirme le lien entre l'obésité et l'augmentation du stress oxydant myocardique (Vincent et al. 1999). Nous avons également observé une augmentation significative de l'expression et de l'activité cardiaque d'enzymes antioxydantes, telles que le superoxyde dismutase de dépendante du manganèse (Mn-SOD) et la catalase. Ce résultat à première vue paradoxal, s'explique par une réponse adaptative du tissu à un stress oxydant accru.

Pour conclure, chez le rongeur, la SAPN conduit à des modifications précoces des circuits hypothalamiques de régulation de l'homéostasie énergique. Cette situation modifie l'expression de nombreux gènes, et affecte le niveau d'hormones circulantes telles que la leptine et l'insuline (Figure 6). Ces changements peuvent conduire à leur tour à des perturbations de l'organisation structurelle et métabolique et induire à plus long terme des altérations de la fonction et de la structure d'organes tels que le tissu adipeux, le foie, le pancréas, le cœur, les vaisseaux. Ces altérations induisent probablement une sensibilité accrue de ces souris à certaines pathologies, notamment cardiovasculaires et métaboliques. Enfin, l'ensemble des travaux précédemment présentés suggère que le niveau nutritionnel pendant la période postnatale immédiate est primordial, car il peut exercer un impact définitif sur le risque cardio-métabolique à l'âge adulte. Il semble ainsi nécessaire de comprendre les mécanismes biologiques, cellulaires et moléculaires, impliqués dans ces modifications induites par la SAPN afin de déterminer leur importance pour la santé humaine et de concevoir des interventions possibles pour prévenir ou traiter leurs conséquences délétères.

Suralimentation Postnatale

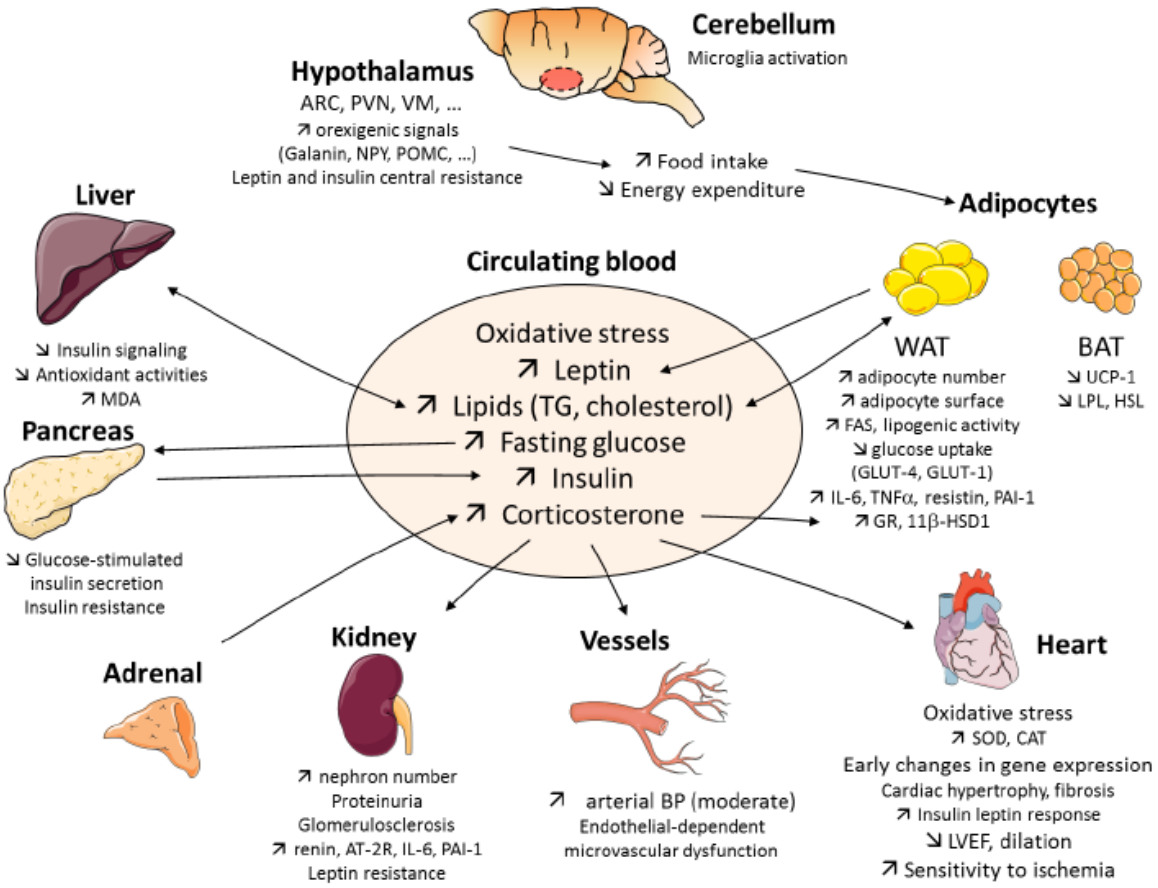

Figure 6 Conséquences physiopathologies de la SAPN chez les rongeurs

D. Restriction calorique

1. Définition

C'est en 1935 qu'une première étude menée chez le rat par McCay et ses collaborateurs, met en évidence qu'une restriction calorique (RC) de 40% à partir du sevrage entraîne une augmentation de l'espérance de vie de ces animaux (McCay et al. 1935). Les conclusions de ce travail ont entrainé un véritable engouement, et de nombreuses études ont alors vu le jour chez d'autres espèces animales, révélant des effets similaires sur la longévité ainsi que sur le retard d'apparition de pathologies liées à l'âge et sur le maintien des fonctions biologiques de l'organisme.

La RC correspond à une diminution de la prise alimentaire sans malnutrition, c'est-à-dire sans induire d'excès ou de carence pour un nutriment donné. Autrement dit, l'abaissement calorique doit concerner l'ensemble des nutriments du régime alimentaire de « base ». Chez l'animal, la méthode la plus répandue pour instaurer une RC nécessite d'abord de mesurer la prise alimentaire individuelle des animaux lorsqu'ils sont nourris *ad libitum*, c'est-à-dire lorsque la ressource alimentaire est disponible à volonté jusqu'à satiété. L'apport calorique est ensuite individuellement abaissé d'un pourcentage précis, variant de 20-60% (Canto et al. 2009).

La RC est une intervention efficace qui augmente la durée de vie et réduit l'incidence et la gravité des pathologies liées à l'âge dans de nombreux modèles animaux, de levures unicellulaires aux primates non humains, en passant par les mouches des fruits. En plus de ces paramètres liés au vieillissement, la RC améliore notablement la résistance à un stress oxydant aigu et sur le plan métabolique, améliore l'homéostasie du glucose, la sensibilité à l'insuline, les profils lipidiques plasmatiques et le niveau de la pression artérielle (Speakman et al. 2011).

2. Espérance de vie

La longévité de très nombreuses espèces, comme le ver *C. elegans* ou la souris, est prolongée par la RC (Sohal et al. 1996, Heilbronn et al. 2003). Chez l'Homme, des travaux conduits sur la population japonaise de l'île d'Okinawa qui comprend un nombre particulièrement élevé de centenaires, indique aussi que la RC - qu'il ne faut pas confondre avec des déficits nutritionnels - pourrait aussi prolonger la durée de vie chez l'Homme (Willcox et al. 2006). L'hypothèse la plus répandue est que la RC diminue le métabolisme basal et donc la consommation d'oxygène. Cette explication fait écho aux idées défendues par Pearl dès les années 20, suggérant que l'activité métabolique globale est inversement corrélée à la

durée de vie des espèces et des individus (Speakman 2005). Cette hypothèse ne semble pas vérifiée chez toutes les espèces, en particulier chez les oiseaux qui possèdent un métabolisme très actif (Barja 1998). Le modèle de la RC a été considéré comme compatible avec la théorie radicalaire du vieillissement, dans la mesure où la consommation d'oxygène par la mitochondrie s'accompagne d'un relargage d'ERO par la chaîne respiratoire. Le taux d'ERO produit est très controversé puisque il est passé d'estimations (réalisées *in vitro*) allant de 2 à 4 % de l'oxygène consommé à des estimations plus réalistes de 0,2 à 0,4 % (Balaban et al. 2005). Néanmoins, on peut comprendre qu'une diminution de la consommation d'oxygène s'accompagne d'une diminution de la production mitochondriale d'ERO et donc, selon la théorie radicalaire du vieillissement, d'un prolongement de la durée de vie. Il n'en demeure pas moins qu'une activité métabolique forte chez certaines espèces ne s'accompagne pas d'une diminution de la longévité (Barja 1998, Bordone et al. 2005). Pour comprendre ce paradoxe, il faut remettre en cause la relation entre la consommation d'oxygène et la production d'ERO. Dans certaines conditions, comme l'exercice physique, une activité métabolique importante ne s'accompagne pas d'une élévation proportionnelle de la production d'ERO. Parmi les mécanismes qui peuvent modifier la relation entre la production d'ERO et la consommation d'oxygène, le découplage mitochondrial, réalisé par les thermogénines (UCP), semble être directement impliqué. Les UCP, dont certaines isoformes sont induites par le stress oxydant, réduisent le gradient de protons au niveau de la membrane mitochondriale interne et, de ce fait, diminueraient la production d'ERO (Pecqueur et al. 2001). Ce rôle des thermogénines demeure cependant controversé. Il est sans doute un peu réducteur de ne voir dans les effets de la RC, que ceux qui sont liés à la résistance aux agressions oxydantes. Des effets hormonaux et métaboliques globaux, en particulier l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, sont sans doute des éléments essentiels à considérer dans cette physiopathologie associée aux processus oxydatifs (Pecqueur et al. 2001).

3. Effet de la restriction calorique sur la fonction métabolique

a) Poids corporel

Presque tous les animaux sous RC perdent du poids. Cependant, la perte du tissu adipeux blanc n'est pas proportionnelle à la perte de poids globale (Bertrand et al. 1980). Par exemple, une RC de moins 40% chez des rats Sprague-Dawley conduit à une perte de poids proportionnelle au niveau de la RC, mais la masse grasse abdominale est diminuée de façon plus importante (Bagga et al. 1995). Dans une autre étude où la masse grasse totale et la masse grasse viscérale ont été mesurées chez les rats de 18 mois sous RC de 55% (43 kcal/d vs 79 kcal/d), il a été observé une perte d'un tiers de la masse grasse

totale et de la masse grasse viscérale par rapport aux rats AL du même âge, sans modification de la masse maigre (Barzilai et al. 1998). Les souris C57BL/6 subissant un jeûne intermittent, c'est-à-dire l'alternance d'un jour de jeûne suivi d'un jour avec nourriture, maintiennent leur poids corporel (Anson et al. 2003) mais, à l'instar d'une RC classique, présentent une baisse de la glycémie et de l'insulinémie. Ces résultats suggèrent que la perte de l'adiposité n'est pas l'élément clé des effets métaboliques bénéfiques de la RC. Comme cela se produit chez les rats sous RC, le jeûne intermittent induit une redistribution de la masse grasse viscérale vers le tissu adipeux sous-cutané (Varady et al. 2007). Par conséquent, la perte de la graisse viscérale jouerait un rôle prépondérant dans les effets bénéfiques de la RC. Dans ce contexte, il a été en effet montré que la résection de la masse grasse viscérale par chirurgie améliorait la sensitivité à l'insuline (Barzilai et al. 1998, Barzilai et al. 2001).

b) Leptine et restriction calorique

La perte de tissu adipeux lié à la RC induit une diminution du taux de plusieurs adipokines circulantes, dont la leptine (Frederich et al. 1995, Frederich et al. 1995). Une RC (- 600 kcal/jour) de 10 semaines chez des femmes obèses entraîne une réduction du poids corporel de 7,5%, accompagnée d'une diminution de la sécrétion de leptine de 40%, et des réductions similaires des taux circulants de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-8 (Arvidsson et al. 2004). La baisse de la leptine dépend partiellement de la composition du régime alimentaire. Ainsi, les rats obèses Zucker voient leurs taux de leptine baissés uniquement lorsqu'ils sont soumis à des régimes pauvres en graisse (16% d'énergie totale venant des graisses) (Beck et al. 2009). Soumis à autre régime, fournissant une énergie totale équivalente (48 kcal/j) mais plus riche en graisse (50% d'énergie totale venant des graisses), qui induit une perte de masse grasse équivalente, leurs taux de leptine ne sont pas modifiés. Chez le rat, il est intéressant de noter que la diminution de leptine induite par une RC s'accompagne d'une restauration de la sensibilité à la leptine (Wilsey et al. 2004).

c) Adiponectine et restriction calorique

Le taux d'adiponectine est augmenté par la RC (Combs et al. 2003, Zhu et al. 2004) et aussi par le protocole de jeûne intermittent (Wan et al. 2010). Ceci est cohérent avec la relation négative entre la masse grasse et le taux d'adiponectine circulant (Rosen et al. 2006). La RC semble être le moyen le plus efficace pour augmenter l'expression génétique et le taux circulant d'adiponectine chez les rongeurs

(Qiao et al. 2011). Cette augmentation de l'adiponectine pourrait expliquer certains effets bénéfiques de la RC.

L'adiponectine a été identifiée la première fois comme un peptide du tissu adipeux, dérégulé lors de l'obésité (Ouchi et al. 1999). Elle est produite exclusivement dans les adipocytes et secrétée dans la circulation sanguine. Elle module de nombreux processus métaboliques : elle favorise le métabolisme des graisses, et joue un rôle anti-inflammatoire, anti-diabétique et anti-athérogène. Des études ont suggéré que l'adiponectine était un signal de faible disponibilité alimentaire.

Une RC de moins 40% pendant 24 semaines augmente l'expression génique de l'adiponectine dans la graisse épididymaire et accroit les taux d'adiponectine circulante chez les souris C57BL/6, quel que soit le régime initial, pauvre ou riche en graisse. La RC augmente également l'adiponectine circulante chez les souris ob/ob (obèses, déficientes en leptine) et souris A/J (résistantes à l'obésité), mais pas chez les souris KO vis-à-vis du PPARα. L'augmentation de l'expression de PPARα chez les souris C57BL/6 sous RC a suggéré que l'expression de PPARα est indispensable à cette augmentation de l'adiponectine au niveau du tissu adipeux (Qiao et al. 2011).

d) Insuline et restriction calorique

De nombreuses études ont rapporté que la RC réduisait les taux circulants d'insuline, de la somatomédine IGF-1 et du glucose (Breese et al. 1991, Argentino et al. 2005, Argentino et al. 2005). La réduction du taux d'insuline et d'IGF-1 se produit rapidement, dès le 5ème jour de RC (Chan et al. 1993) et s'accentue avec le temps. La diminution de l'ARNm d'IGF-1 au niveau du foie est corrélée à la baisse de la masse corporelle chez des rats sous RC inférieure à 40% (Breese et al. 1991).

Les diminutions d'IGF-1 et d'insuline sous RC ont un lien avec ses effets sur la longévité. Des mutations impliquant des défauts de la voie de signalisation de l'IGF-1 et de l'insuline intracellulaire chez *C. elegans* et *D. melanogaster* conduisent à une durée de vie plus longue (Berryman et al. 2008, Kenyon 2011). Les études réalisées chez les souris présentant des défauts dans les voies signalisation d'insuline/IGF-1 ont montré des résultats similaires (Selman et al. 2008, Selman et al. 2011).

Même si la RC diminue l'insulinémie, les animaux sont capables de répondre correctement au glucose car le tissu musculaire augmente ses capacités d'absorption. Cette pénétration de glucose induite par l'insuline est multipliée par 4 chez des rats témoins et par 12 chez des rats sous RC (Agote et al. 2001). Bien que l'expression musculaire du récepteur à l'insuline soit augmentée sous l'effet de la RC, l'activité de PI3K est abaissée et le transporteur GLUT-4, le transporteur principal du glucose dans le muscle, est sévèrement réduit. Cette diminution est cependant compensée par une translocation plus

efficace des GLUT4 à la surface cellulaire en réponse à l'insuline. De plus, GLUT-1, GLUT-3 et GLUT-5, qui sont normalement des isoformes mineures du transporteur de glucose dans le muscle squelettique, sont tous augmentés par la RC chez le rat. L'élévation de ces transporteurs mineurs de glucose, ainsi que l'amélioration de la translocation de GLUT-4 contribuent à une meilleure pénétration du glucose induite par l'insuline dans le muscle squelettique (Agote et al. 2001).

Des études ont suggéré que la voie signalisation de l'IGF-1 et de l'insuline pourrait avoir un impact direct sur le niveau du stress oxydant et que cet effet pourrait être lié aux effets sur la longévité. Il a été démontré que l'administration d'insuline chez le rat sous RC inverse la réduction du potentiel mitochondrial et augmente la production d'H_2O_2 (Lambert et al. 2004, Lambert et al. 2004). En outre, la voie de signalisation de l'insuline stimule l'autophagie. Une administration hebdomadaire tout au long de la vie d'un médicament anti-lipolytique, le 3,5-dimethylpryrazole , afin d'abaisser les taux de glucose et d'insuline, active l'autophagie (Bergamini et al. 2003, Del Roso et al. 2003).

4. Effet de restriction calorique sur la fonction cardiovasculaire

L'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires sont les principales causes de morbidité et de mortalité liées à l'âge dans les pays occidentaux (Lakatta 2003, Lakatta et al. 2003, Lakatta et al. 2003). Les effets bénéfiques de la RC semblent aussi s'étendre à la fonction cardiaque, ce qui a été reconnu au cours du siècle dernier. En effet, pendant la deuxième guerre mondiale, la réduction des apports nutritionnels s'est accompagnée d'une baisse de la mortalité due aux maladies coronariennes (Strom et al. 1951). Par la suite, plusieurs études ont montré que la RC pouvait prévenir la survenue de maladies cardiovasculaires et retarder le vieillissement cardiaque (Walford et al. 1992, Fontana et al. 2004, Fontana et al. 2007, Fontana 2008). La RC a été jugée très efficace pour réduire les risques d'athérosclérose chez l'Homme dans l'étude « Biosphere » réalisée sur 2 ans (Walford et al. 1992) et dans une autre étude où les individus se sont imposés eux-mêmes une RC pendant une durée moyenne de 6 ans (Fontana et al. 2004). Dans ces deux études, la RC entraînait une diminution significative des taux de cholestérol circulant, de LDL, de triglycérides, de glucose et d'insuline à jeun ainsi qu'une baisse des pressions artérielles systolique et diastolique (Walford et al. 1992, Fontana et al. 2004). Cependant, des résultats contradictoires ont été trouvés quant au taux des HDL, qui a augmenté dans l'étude de RC auto-imposée (Fontana et al. 2004) mais a diminué dans l'étude « Biosphère » (Walford et al. 1992). Cela pourrait être expliqué par des différences de composition des régimes alimentaires : l'alimentation de l'étude « Biosphère » était largement végétarienne, très faible en matières grasses (10% de l'apport énergétique), riche en glucides (76% de l'apport énergétique) et avec un apport protéique

correspondant à 14% de l'apport énergétique, contrairement à l'étude de Fontana et coll. où 46% de l'apport énergétique provenait des protéines.

Des effets similaires ont été trouvé chez les singes, avec une diminution du glucose et de l'insuline à jeun (Kemnitz et al. 1994, Lane et al. 1995), une baisse du LDL cholestérol, des phospholipides (Edwards IJ et al. 2001) et une diminution des triglycérides, mais pas du cholestérol total sérique (Verdery et al. 1997). Toutes ces modifications sont susceptibles de contribuer à l'effet cardioprotecteur de la RC. Une simple perte de poids par la RC peut améliorer la fonction cardiaque. Une étude clinique a comparé l'effet d'une augmentation de 20% de la dépense énergétique seule par rapport à une baisse de 20% de l'apport énergétique seul (RC) sur les risques métaboliques des maladies coronariennes (Fontana et al. 2007). Des améliorations importantes et similaires sur les principaux facteurs de risque des maladies coronariennes ont été trouvées dans les deux cas.

Ces effets bénéfiques sur la fonction cardiovasculaire peuvent être expliqués par des adaptations biochimiques et cellulaires, associant le stress oxydant, la fonction mitochondriale, l'inflammation, l'apoptose et l'autophagie. Les cardiomyocytes, en raison de leur contraction en continu, sont considérés comme les cellules les plus énergétiquement exigeantes du corps (Severs 2000). Les résultats de microarray d'oligonucléotides à haute densité, pour définir des modifications transcriptionnelles associées au vieillissement et à la RC dans le muscle squelettique de souris (Lee et al. 1999), le cerveau (Lee et al. 2000) et le cœur (Lee et al. 2002), suggèrent des modifications distinctes entre les tissus. En effet, pour chaque organe, le vieillissement entraine des modifications uniques au niveau trancriptionnel. Les résultats obtenus au niveau du muscle squelettique et du cerveau ont permis de proposer que le stress oxydant pourrait être une cause importante des processus de vieillissement des tissus post-mitotiques. En revanche, le profil transcriptionnel au niveau cardiaque suggère que la RC protège les myocytes de la mort cellulaire associée à l'âge (Lee et al. 2002). Ces résultats sont en accord avec les premières études qui ont montré des effets bénéfiques de la RC vis-à-vis des cardiomyopathies (Berg et al. 1960, Maeda et al. 1985) et sont compatibles avec une analyse globale plus récente de l'expression génique (arrays Affymetrix) dans les cœurs murins (Dhahbi et al. 2006). Cette étude indique qu'une RC à long terme (8 semaines) protège les cardiomyocytes de l'apoptose liée à l'âge en réduisant les dommages de l'ADN, en renforçant leur capacité de réparation, en réduisant l'expression des gènes pro-apoptotiques et en activant des gènes inhibiteurs de l'apoptose. La RC a également des effets sur des gènes associés à la fibrose et au remodelage tissulaire ainsi qu'à la matrice extracellulaire, au cytosquelette, à la mort cellulaire, à l'inflammation et sur des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme des acides gras (Dhahbi et al. 2006).

La RC a un effet protecteur vis-à-vis des lésions ischémiques (Broderick et al. 2001). Cet effet peut être associé aux modifications de la fonction mitochondriale cardiaque (Broderick et al. 2002). Un autre protocole de RC associée à un jeûne intermittent (RC-JI), avec accès à la nourriture un jour sur deux, influe également sur les lésions ischémiques cardiaques chez les rats. 24 heures après l'induction d'un l'infarctus du myocarde (IDM) par ligature de l'artère coronaire, la taille de l'infarctus dans le groupe RC-JI était 2 fois plus petite et le nombre de cardiomyocytes apoptotiques dans la zone à risque était 4 fois moins important par rapport au groupe contrôle. La réponse inflammatoire était significativement réduite dans ce groupe. Les échocardiographies révèlent que, pendant les dix semaines après IDM (avec la poursuite du traitement RC-JI, le remodelage du ventricule gauche et l'expansion de l'infarctus du myocarde, observés dans le groupe contrôle, étaient absents dans le groupe RC-JI. Dans un sous-groupe d'animaux présentant des tailles d'infarctus similaires une semaine après l'IDM, le groupe sous RC-JI avait eu un remodelage plus faible, une meilleure fonction du VG et une absence d'expansion de l'IDM par rapport au groupe contrôle. La RC protège le cœur contre les lésions ischémiques et atténue le remodelage cardiaque post IDM par des mécanismes anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (Ahmet et al. 2005). Cet effet protecteur de la RC semble lié à l'adiponectine (Wan et al. 2010), qui est généralement augmentée chez les animaux en RC.

L'amélioration fonctionnelle de la récupération post-ischémique des cœurs par la RC est associée à une augmentation de l'oxydation du glucose au cours de la reperfusion par rapport aux témoins. Les cœurs de souris sous RC présentent une augmentation des taux cardiaques d'ATP et une plus faible activité de l'AMPK à la fin de la reperfusion par rapport à ceux de souris témoins (Sung et al. 2011), ce qui est cohérent avec les effets d'amélioration de l'approvisionnement en énergie par la RC. Les effets du pré-conditionnement ischémique (PCI), une méthode endogène de protection contre les lésions de reperfusion cardiaque, ont été évalués sur des cœurs isolés de rats adultes (6 mois) et âgés (24 mois) issus d'animaux nourris AL ou soumis à une RC 40% (Abete et al. 2002). Dans les cœurs de rats adultes, la récupération de la pression développée était significativement améliorée par le PCI par rapport aux cœurs contrôles (85,2 ± 19% vs 51,5 ± 10%, $p < 0,01$). Chez les cœurs de rats âgés, l'effet cardioprotecteur du PCI était aboli, mais il était restauré partiellement par la RC (66,6 ± 13% vs 38,3 ± 11%, $p < 0,05$). Bien que l'effet de la RC n'ait pas restauré complètement l'effet du PCI chez les animaux âgés par rapport aux groupe contrôle adulte, des études ultérieures ont montré que la combinaison de la RC avec un entraînement physique pouvait restaurer complètement l'effet du PCI chez les animaux âgés (Abete et al. 2005). Par conséquent, le PCI réduit le dysfonctionnement post-ischémique sur le cœur, et cet effet qui diminue avec l'âge pourrait être partiellement restauré par la RC.

L'effet bénéfique de la RC s'étend au système circulatoire avec une diminution de la fibrosclérose de l'aorte liée à l'âge. Il est suggéré que cet effet protecteur soit associé à la diminution du stress oxydant observé chez les animaux en RC. Par exemple, le 4-hydroxy-2,3-nonénal (HNE) induit l'expression et la synthèse du transforming growth factor β 1 (TGFβ 1) qui stimule la fibrogenèse. Il est, par conséquent possible que par la diminution du stress oxydant, la RC réduise les niveaux de HNE, donc l'expression de TGFβ 1 et le dépôt de collagène, probablement par la régulation de l'activation de Jun-N terminale kinase et de l'AP-1 (Chiarpotto et al. 2006).

Le stress oxydant joue un rôle dans de nombreuses pathologies liées à l'âge et en particulier sur les maladies cardiovasculaires (Rochette et al. 2014). La RC diminue la production des EROs mitochondriales liées à l'âge dans la plupart des tissus, y compris les vaisseaux et le cœur (Gredilla et al. 2001). La RC à long terme atténue significativement le stress oxydant, diminue l'activité des NAD(P)H oxydases et améliore la fonction endothéliale dans l'aorte de rats âgés F344 (Csiszar et al. 2009). La RC peut augmenter la biodisponibilité du NO empêchant ainsi l'athérogenèse (Nisoli et al. 2005) (Ungvari et al. 2008, Kondo et al. 2009).

Le vieillissement est associé à l'inflammation vasculaire chronique de bas grade qui favorise le développement des maladies cardiovasculaires (Danesh et al. 2000). La RC entraîne une diminution de plusieurs marqueurs inflammatoires, comme le TNFα et l'IL-6 qui sont en corrélation avec la fonction cardiovasculaire (Spaulding et al. 1997). La RC à la fois inhibe l'augmentation des activités de JNK et de P38 liées à l'âge au niveau de l'aorte de rats âgés et inverse l'augmentation de l'activité de l'AP-1 (Castello et al. 2005). Les prostanoïdes, connus pour jouer un rôle important dans l'inflammation et les maladies cardiovasculaires, voient leurs niveaux augmenter avec l'âge mais diminuer par la RC (Kim et al. 2004). L'adiponectine, qui exerce un effet anti-inflammatoire, est également augmentée lors de la RC chez les souris (Shinmura et al. 2007) ainsi que chez l'homme (Antoniades et al. 2009).

E. Stress oxydant et maladies cardiovasculaires

1. Définition du stress oxydant et des radicaux libres

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 électronique externe, ce qui leur confère une certaine instabilité. En effet ces radicaux libres cherchent à apparier leur électron célibataire en réagissant avec de nombreuses molécules de leur environnement, provoquant des dommages cellulaires.

Le plus connu de ces radicaux libres de l'oxygène est l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), issu de la réduction monovalente du dioxygène. La dismutation de cet $O_2^{\bullet -}$ en présence de protons entraîne la formation de dioxygène et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, l'H_2O_2 se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), en un ion OH^- et un radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + Fe^{3+} + HO^-$$

Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) qui régénère Fe^{3+} en Fe^{2+} selon la réaction d'Haber-Weiss

$$O_2^{\bullet -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et de fer permet la production du radical hydroxyle ($HO^{\bullet}$). L'$HO^{\bullet}$, avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN…) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L'$HO^{\bullet}$ apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des EROs (Gutteridge et al. 1993).

Parmi les ERO, certaines possèdent une faible réactivité et peuvent entrer dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs systèmes biologiques (Wolin 1996). Le stress oxydant est défini en ce sens comme un déséquilibre en faveur d'un excès de molécules pro-oxydantes aux conséquences

éventuellement néfastes, induisant des altérations biochimiques intracellulaires, telles que l'oxydation des lipides, des protéines (Pamplona et al. 2000) et de l'ADN (Lass et al. 1998).

2. Principales sources de radicaux libres

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de radicaux libres parmi lesquelles l'auto-oxydation des petites molécules, des enzymes comme la xanthine oxydase, ou les NADPH oxydases, des organites et structures cellulaires comme le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et la chaine respiratoire mitochondriale (CRM).

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones, est une importante source d'EROs (Freeman et al. 1981). Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'$O_2^{\bullet -}$.

La xanthine oxydase, enzyme dérivée de la xanthine deshydrogènase, catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l'$O_2^{\bullet -}$ (McKelvey et al. 1988).

Les NADPH oxydases jouent un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes (Babior 1999). En effet, lors de la phagocytose, ces enzymes présentes dans la membrane plasmique des phagocytes, catalysent la formation d'$O_2^{\bullet -}$. Il existe aussi des NADPH oxydases dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire, la synthèse d'hormones ou la réactivité vasculaire (Bedard et al. 2007).

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions nécessaires à détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques (Freeman et al. 1983). Les plus connues de ces enzymes sont les cytochromes P450 (dont certaines isoformes peuvent se retrouver au sein de la mitochondrie) qui oxydent les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des EROs (MOREL et al. 1999). Il est admis actuellement que cette production radicalaire participe à la régulation de certaines fonctions du réticulum.

Les peroxysomes constituent une importante source de production d'H_2O_2 cellulaire (Boveris et al. 1972). Toutefois, l'H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d'H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

Cependant, la principale source d'EROs est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des EROs cellulaires (Balaban et al. 2005). De plus, elle constitue 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. Les électrons qui sont perdus par la chaîne respiratoire vont conduire à la formation d'anion superoxyde (Chance et al. 1979), qui sera rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène. 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 et al. 2003).

Un des mécanismes clé pour moduler la production des EROs mitochondriales est le potentiel membranaire mitochondrial. En théorie, le potentiel membranaire joue un rôle essentiel sur la production de superoxyde, en modulant la vitesse à laquelle les électrons passent à travers les composants de la chaîne de transport d'électrons, les rendant ainsi plus ou moins susceptibles de se combiner avec l'oxygène (Brand et al. 2004). Le potentiel membranaire est défini par l'équilibre entre la vitesse à laquelle les protons sont « pompés » à partir de la matrice vers l'espace inter-membranaire, et la vitesse à laquelle ces protons retournent à la matrice. Le retour des protons à la matrice peut être réalisé par trois mécanismes : le premier par l'intermédiaire de l'ATP synthase (complexe V) et serait couplé à la synthèse d'ATP ; le deuxième mécanisme serait un processus de «fuite» directement à travers la membrane ; enfin, le troisième mécanisme s'effectuerait par l'intermédiaire de canaux spécifiques. Pour un même taux d'oxygène consommé, plus la fuite de protons est importante, moins la production d'ATP est efficace.

Les principaux canaux permettant le transfert de protons à travers la membrane et permettant le découplage de la synthèse de l'ATP sont, comme nous l'avons déjà évoqué, la famille de protéines UCP, comprenant UCP1 exprimé dans le tissu adipeux brun, UCP2 exprimé de façon ubiquitaire, UCP3 dans le muscle squelettique et le TAB, UCP4 et UCP5 dans le cerveau. En outre, plusieurs autres protéines membrannaires ont une activité protonophorique - comme l'ANT. En théorie l'augmentation du taux ou de l'activité d'UCP et d'ANT devrait diminuer le potentiel membranaire et donc réduire la production d'EROs (Brand 2000).

3. Les systèmes antioxydants

Face à un environnement riche en oxygène qui promeut la formation d'EROs, les organismes aussi bien eucaryotes que procaryotes, possèdent différents mécanismes de défense antioxydant comprenant de petites molécules antioxydantes, telles que l'acide ascorbique (vitamine C), l'alpha-tocophérol (vitamine E), le glutathion, l'acide urique, la bilirubine ou encore la tétrahydrobioptérine. De plus, les cellules des mammifères ont mis en place au cours du développement des enzymes efficaces contre les EROs. On distingue alors donc deux systèmes de défenses, le système non-enzymatique et le système enzymatique (Harrison et al, 2003).

a) Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Nous ne citerons ici que les composes les plus importants sachant que de nombreux composes endogènes sont doué de propriété antioxydantes.

(1) Le système glutathion :

Le glutathion (GSH) comporte 3 acides aminés dans sa structure, l'acide glutamique-cystéine-glycine. Il est présent préférentiellement sous forme réduite au niveau intra-cellulaire où il agit comme antioxydant. Ce GSH aussi est un cofacteur d'enzymes impliquées dans divers processus métaboliques, notamment dans le maintien des communications intercellulaires ainsi que dans la prévention de l'oxydation des groupements thiols de par son pouvoir réducteur.

(2) Les vitamines C et E :

La vitamine C ou acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble qui, grâce à son potentiel redox, est capable de céder un électron à pratiquement tous les radicaux libres présents dans son environnement immmédiat. Sa forme radicalaire, le radical ascorbyle $AH^{\bullet}$, est peu réactif vis-à-vis des constituants cellulaires et il réagit avec lui-même afin de former la vitamine C et l'acide déhydroascorbique. De part ses capacités de régénération, la vitamine C participe à l'arrêt de la propagation des réactions radicalaires en chaîne.

La vitamine E ou l'alpha-tocophérol est une molécule lipophile qui s'insère au sein des membranes cellulaires afin de protéger les constituants membranaires que sont les lipides, les lipoprotéines et les protéines.

Ces deux vitamines agissent conjointement pour la détoxification des radicaux libres, la vitamine C permettant la régénération de la vitamine E.

b) Les enzymes anti-oxydantes

(1) Les superoxydes dismutases :

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des systèmes antioxydants endogènes présents chez presque tous les organismes vivants. Il s'agit de métalloenzymes qui réalisent la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène selon la réaction suivante :

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Chez l'Homme, il existe trois isoformes de la SOD, de SOD1 à 3, qui sont différentes par leur contenu métallique, la position du gène sur les chromosomes, leur localisation cellulaire ainsi que leur structure quaternaire. Elles ont toutes en commun la capacité d'accélérer la dismutation des ions superoxydes par des réactions d'oxydations et de réductions successives.

La SOD1 ou Cu/ZnSOD est une enzyme homodimérique, localisée dans le cytosol et qui a pour masse molaire 32 kDa. Ses deux sous-unités contiennent chacune un atome de cuivre, qui est nécessaire à l'activité catalytique, et un atome de zinc, qui participe à la stabilisation de la molécule. La SOD 1 permet de réduire la formation d'H_2O_2 en évitant les réactions en chaîne initiées par l'anion superoxyde, ce qui lui confère un rôle majeur dans la défense antioxydante.

La SOD2 ou MnSOD est une enzyme mitochondriale tétramérique, de masse moléculaire d'environ 88 kDa, et que l'on retrouve principalement au niveau de tissus donc les cellules sont riches en mitochondries : le cœur, le cerveau, le foie et les reins. Chaque sous-unité contient un atome de manganèse qui va changer de forme lors des étapes de la dismutation de l'anion superoxyde.

La SOD3 ou SOD extracellulaire (ecSOD) est une enzyme tétramérique de 135 kDa, située principalement au niveau de la matrice extracellulaire des tissus et partiellement au niveau des liquides extracellulaires. Chacune de ses sous-unités de 30 kDa possède un atome de cuivre et un atome de zinc. Son activité est inhibée par le peroxyde d'hydrogène. Ses propriétés sont encore mal connues à cause des difficultés de purification de cette enzyme.

(2) La catalase

La catalase est une enzyme tétramérique héminique présente principalement dans les peroxysomes, les érythrocytes, les hépatocytes et dans le rein. La catalase humaine a une masse moléculaire de 220 kDa et le site actif contient un groupement protoporphyrine associé à un atome de fer sous forme de Fe^{3+} (Ko et al, 2000). La catalase réalise la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau : $2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$

(3) Les glutathion peroxydases: GPx

Les glutathion peroxydases sont des enzymes tétramériques qui contiennent un résidu sélénocystéine dans chacune de leurs sous-unités. Ce résidu leur confère une activité dépendante de la quantité de sélénium présente dans les tissus. La GPx a pour rôle de détoxifier le peroxyde d'hydrogène en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation du glutathion selon la réaction suivante :

$$ROOH + 2\ GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$$

Le glutathion réduit (GSH) est transformé en glutathion oxydé (GSSH).

4. Les pathologies cardiovasculaires associées au stress oxydant

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 (Li et al. 1995). Ces résultats ont été appuyés par des études de mutagenèse dirigée, induisant une délétion spécifique de la MnSOD cardiaque, montrant une défaillance de la respiration mitochondriale associée à une insuffisance cardiaque congestive (Nojiri et al. 2006). Lorsqu'elle est dépourvue de MnSOD, mitochondrie est néanmoins capable de neutraliser une partie des EROs telles que le peroxyde d'hydrogène à l'aide de la peroxyredoxine 3 (Prx3) (Kang et al. 1998). E Une surexpression de cette Prx3 chez la souris diminue le remodelage et l'insuffisance cardiaque après une ischémie (Matsushima et al. 2006).

De très nombreuses études expérimentales ont démontré l'implication d'autres sources de production d'EROs dans la physiopathologie cardiovasculaire. Les NADPH oxydases jouent ainsi un rôle

dans le développement de la dysfonction endothéliale, de l'hypertension artérielle, de l'athérosclérose, de l'anévrisme de l'aorte abdominale, de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaque (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 (Landmesser et al. 2003, Sicard et al. 2006).

La NOS endothéliale (eNOS ou NOS3) participe aussi à l'altération du système cardiovasculaire par l'intermédiaire de son co-facteur, la tetrahydrobioptérine (BH_4), qui, lorsque sa biodisponibilité est diminuée, est responsable d'un 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 néanmoins un rôle cardioprotecteur, en atténuant l'HVG et en rétablissant les fonctions cardiaques après un infarctus (Rochette et al. 2013).

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 enzymes génératrices de l'acide hypochloreux, sont capables d'induire une dysfonction endothéliale, et peuvent de manière concomitante, stimuler le découplage de la eNOS (Xu et al. 2006). Le taux plasmatique de MPO est corrélé positivement à la sévérité des lésions athéromateuses coronariennes et la MPO circulante apparaît comme un bon indicateur pronostic des coronaropathies (Duzguncinar et al. 2008).

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.

5. La restriction calorique et le stress oxydant

Des études ont montré que la RC etait capable de réduire le stress oxydant (Yu 1996, Merry 2000, Merry 2004, Ash et al. 2011). En effet, des rats ayant bénéficié d'une RC de longue durée présentent une meilleure protection tissulaire antioxydante, notamment au niveau du cerveau, des poumons, du foie, des reins et du cœur (Aydin et al. 2007, Aydin et al. 2009).

La réduction du stress oxydant peut être réalisée par plusieurs mécanismes: 1) une réduction de la production des EROs, 2) une augmentation de la capacité des systèmes antioxydants, 3) une réduction

des dommages qu'ils causent par l'activation des processus de réparation afin que le niveau des détériorations soit diminué. Des études ont suggéré que la RC pouvait intervenir sur ces trois mécanismes de réduction du stress oxydant.

Comme nous l'avons déjà évoqué, la principale source cellulaire d'EROs est la mitochondrie. Une réduction de la production d'anions superoxyde a été montrée sur des mitochondries isolées d'animaux en RC (Sohal et al. 1994, Sohal et al. 1996). Cette diminution est principalement localisée au niveau du complexe I de la CRM (Barja 2004). Les effets de la RC sur la production mitochondriale d'EROs ne semblent pas être médiés par des réductions de l'activité des composants de la CRM. En effet, certaines données ont suggéré que la biogenèse mitochondriale est stimulée par la RC, mais ce concept a été discuté. Les mitochondries de rats en RC présentent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles particulières, en particulier en relation avec leur composition en acide gras, l'activité de leur chaîne respiratoire, leur capacité antioxydante et leur contenu en hydroperoxyde (Armeni et al. 2003).

Les mitochondries de rats en RC montrent une baisse d'environ 30 mV du potentiel membranaire par rapport à celui de rats contrôles du même âge (Lal et al. 2001, Lambert et al. 2004). Pour un potentiel membranaire donné, les mitochondries des rats en RC ont une plus grande fuite de protons à travers la membrane interne (Lal et al. 2001). Cette différence entraîne une diminution de la production mitochondriale d'EROs (Lambert et al. 2004). L'augmentation de la fuite des protons peut provenir d'une augmentation de la fluidité de la membrane elle-même, mais aussi d'une augmentation du nombre et de l'activité des transporteurs de protons comme UCP et ANT. L'ANT a été montré comme le principal moyen de fuite des protons stimulé par la RC dans le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux brun. De plus l'UCP1 est aussi activé dans les mitochondries du tissu adipeux brun. En conclusion, la RC modifie la fuite des protons, le potentiel de membrane et diminue donc la production d'EROs (Ash et al. 2011).

Comme il est indiqué ci-dessus, la fuite des protons au travers de la membrane mitochondriale peut aussi être influencée par la composition membranaire, dont la perméabilité principalement liée aux acides gras insaturés. En effet, des acides gras insaturés ne peuvent pas être empilés étroitement en raison de leurs doubles liaisons. Une membrane composée principalement d'acides gras insaturés est donc extrêmement fluide ce qui permet aux protons de passer plus facilement de nouveau dans la matrice. Paradoxalement, la RC entraine une augmentation de la fuite des protons, mais elle entraine aussi une augmentation des acides gras saturés, au détriment des acides gras insaturés (Laganiere et al. 1993). Ce changement dans la composition des acides gras membranaires est un mécanisme important dans la protection membranaire contre le stress oxydant. En effet, si les acides gras insaturés favorisent

la fuite des protons et réduisent le potentiel membranaire, leur double liaison est plus encline à la peroxydation par les radicaux libres. En rendant les membranes plus saturées, les animaux en RC peuvent donc réduire les dommages membranaires lipidiques induits par les radicaux libres.

En plus de réduire la production d'ERO et de modifier leurs membranes de sorte qu'elles soient moins susceptibles aux dommages des ERO, les animaux sous RC modulent également leurs défenses antioxydantes. Les défenses antioxydantes endogènes diminuent de 20-30% au cours du vieillissement dans le foie. Une RC de 30% a des effets protecteurs majeurs sur le système antioxydant endogène hépatique : elle limite la diminution du glutathion chez des rats âgés et maintient les activités enzymatiques de SOD et catalase. Cependant, l'activité de la glutathion réductase (GR) et de la GPx ne sont pas affectées par l'âge ou par la RC (Chen et al. 1996). Dans le rein, la RC augmente de manière significative le ratio GSH/GSSG. Toutefois, aucun changement significatif n'est observé pour la SOD, la catalase, la GR, la GSH, l'acide urique, le malondialdéhyde ou la sensibilité *in vitro* à la peroxydation dans les reins (Cadenas et al. 1994). La stratégie visant à réduire les dommages oxydatifs semble ainsi être variable en fonction des tissus.

La dernière étape de la défense vis à vis du stress oxydant est de renforcer la capacité de réparer les dommages, ou d'augmenter la dégradation des macromolécules endommagées. La RC réduit les dommages de l'ADN et favorise la stabilité génomique en augmentant la capacité de réparation de l'ADN telle que la réparation par excision de base (BER : base excision repair). La RC améliore la capacité de la BER diminuée par l'âge en l'augmentant dans le cerveau, le foie, la rate et les testicules. La RC, chez les animaux âgés, restaure une capacité de BER identique à celle d'animaux jeunes nourris AL. Cet effet de la RC est accompagné d'un renversement de la baisse de l'ADN polymérase β (pol β) liée à l'âge, qui est l'enzyme importante dans la BER. De plus, chez des animaux jeunes (4-6 mois) la RC a les mêmes effets bénéfiques que chez les animaux âgés, elle augmente la capacité de BER, la protéine pol β et les ARNm de pol β (Cabelof et al. 2003). Les effets de la RC sur le stress oxydant sont résumés dans la figure 7.

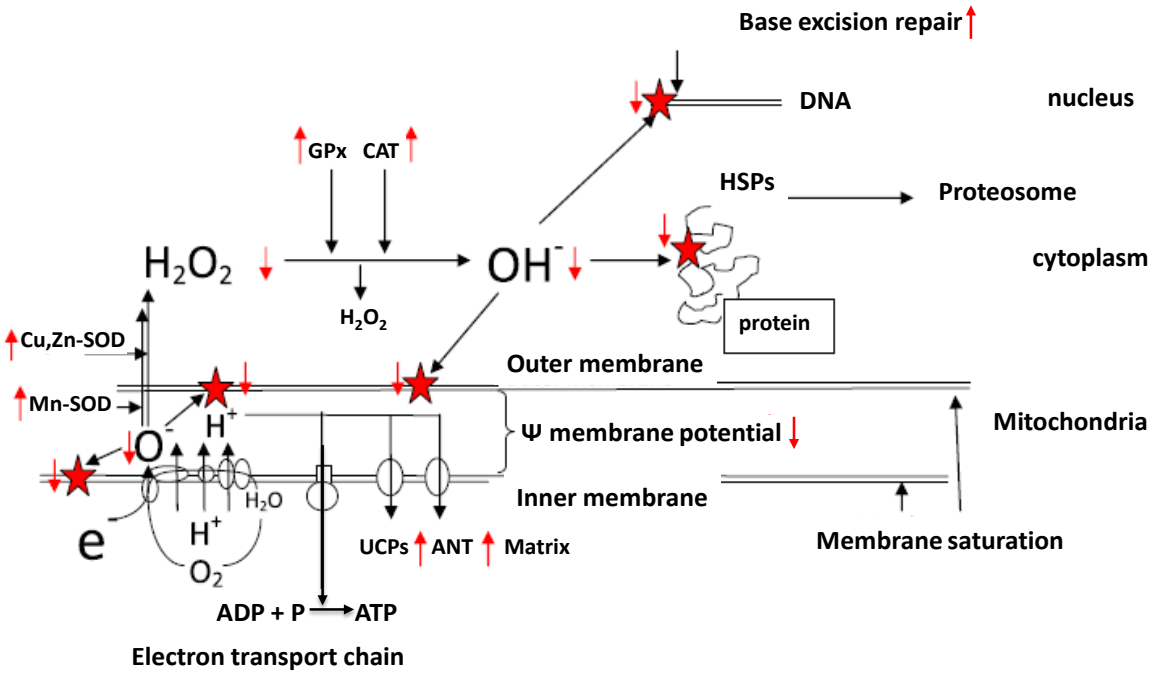

Figure 7 : Schéma montrant les effets de la RC sur le stress oxydant

La RC induit une augmentation du niveau et de l'activité de l'ANT et de l'UCP pour réduire le potentiel membranaire mitochondrial (Ψ), ce qui se traduit par une diminution de la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il s'ensuit une diminution des dommages lipidiques au sein de la membrane mitochondriale, accentuée par l'augmentation de la saturation des lipides membranaires. L'augmentation de la SOD accroit la dégradation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui est converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), transformé ensuite en eau par la GPx et la catalase. Par conséquent la production du radical hydroxyle toxique ($HO^{\bullet}$) est réduite au profit de la formation d'eau. Les dommages oxydatifs sur les protéines et l'ADN sont diminués grâce à la baisse de la quantité d'$HO^{\bullet}$et grâce à l'amélioration des capacités de dégradation et de la réparation par excision de base (BER) (Speakman et al. 2011).

II. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Plusieurs travaux, conduits sur le plan clinique et expérimental, ont indiqué que l'environnement lors de périodes précoces du développement de l'individu, peut déterminer et influencer la régulation métabolique et le risque cardiovasculaire à l'âge adulte. Chez les rongeurs, une SAPN peut être induite, comme nous l'avons préalablement indiqué, en réduisant la taille des portées juste après la naissance. Des études ont montré que la SAPN induit un surpoids non seulement au sevrage mais aussi tout au long de la vie. Les rongeurs élevés dans une portée de petite taille présentent une hyperphagie, une dyslipidémie et un déséquilibre de la balance glucose-insuline. Les travaux de notre équipe ont montré qu'en plus des modifications métaboliques, la SAPN influençait la fonction cardiaque et la susceptibilité du cœur aux lésions d'ischémie-reperfusion.

Dans la littérature, il a été montré que la SAPN modifie durablement le comportement alimentaire et la dépense énergétique du rongeur, ce qui semble relié à des perturbations au niveau de noyaux hypothalamiques impliqués dans ce contrôle, et se caractérise par une résistance du noyau arqué à la leptine et à l'insuline, accompagnée d'une augmentation de signaux orexigènes. Ainsi, **une des premières questions à laquelle nous avons souhaité répondre dans le cadre de ce travail de Doctorat était d'évaluer si une RC modérée, visant à normaliser la surcharge pondérale des souris SAPN et effectuée à l'âge adulte pourrait rétablir l'équilibre métabolique.**

L'augmentation du risque cardiovasculaire à l'âge adulte observée chez les rongeurs soumis à une SAPN pourrait soit relever d'un effet direct de la programmation précoce sur le système cardiaque et vasculaire, soit constituer un effet secondaire du surpoids et des modifications métaboliques à l'âge adulte. Des changements de mode de vie, telles que l'augmentation de l'activité physique et/ou une alimentation plus saine et moins calorique, sont connus pour améliorer les critères du syndrome métabolique. **Une deuxième question que nous nous sommes posée était d'étudier si l'amélioration des facteurs de risques de maladies cardiovasculaires, notamment le poids corporel et la fonction métabolique, était susceptible d'améliorer la fonction cardiaque et la récupération post-ischémique des cœurs de souris ayant subi une SAPN.**

En outre, la fonction mitochondriale et le niveau du stress oxydant sont impliqués de façon majeure dans la régulation de la fonction cardiaque. Afin de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans les modifications myocardiques induites par la SAPN et la RC, nous nous sommes intéressés dans **une troisième partie, au niveau du tissu cardiaque à la respiration mitochondriale et aux conditions du stress oxydant**.

Enfin, nous avons exploré **les voies de signalisation de la leptine, de l'insuline et de l'AMPK au niveau du cœur compte tenu de leur importance primordiale dans la régulation de la fonction cardiaque**.

III. MATERIELS ET METHODES

A. Modèle animal et protocole de RC

Notre étude a été approuvée par le comité d'éthique local (Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animale, Université- Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France, protocole numéro 00412,03) qui veille à ce que soient mises en œuvre toutes les mesures nécessaires pour garantir le soin, le bien-être et le bon usage des animaux de laboratoire. Le statut sanitaire des animaux a été observé tous les deux jours. Aucun signe spécifique de stress, de maladie ou de douleur (comportement anormal, diminution de consommation alimentaire et/ou hydrique, prostration) n'ont été observés durant au cours de l'étude.

Des souris femelles adultes C57BL/6 (Charles River, L'Arbresle, France) ont été mises en accouplement avec des souris mâles C57BL/6 pendant 3 jours, puis séparées des mâles et mises en cages individuelles tout au long de la période de gestation et d'allaitement. Les souris ont eu un accès libre à l'eau et à une alimentation granulée adaptée (A03, SAFE diets, Augy, France). Le deuxième jour après la naissance, les souriceaux males C57BL6 ont été répartis aléatoirement au nombre de 9 par mère afin de constituer le groupe témoin (normo-alimentés : NA), ou au nombre de 3 par mère afin d'induire une situation de SAPN (suralimentés en période postnatale: SAPN). Après le sevrage, les souris des deux groupes, identifiées individuellement par puces magnétiques et regroupées au nombre de 9 par cage, ont eu un accès libre à volonté à une nourriture standard d'entretien (A04, DAFE diets, Augy, France) et à la boisson jusqu'à l'âge de 6 mois. Pendant toute la durée de l'étude, les souris ont été maintenues dans des conditions d'élevage standard : température ambiante contrôlée et cycle jour/nuit de 12 heures. Le poids corporel a été évalué périodiquement (toutes les semaines, puis tous les mois) et la consommation de nourriture a été évaluée de manière hebdomadaire à l'âge de 5 mois.

A l'âge de 6 mois, un sous-groupe de souris de NA et SAPN a été soumis à une RC (NARC et SARC) de moins 20% de leur consommation habituelle pendant 4 semaines. La quantité de nourriture a été calculée et déposée tous les jours pour les groupes en RC. Les autres souris des 2 groupes sont maintenues en alimentation ad libitum (NAAL et SAAL).

B. Procédure expérimentale

Le poids corporel et la consommation alimentaire des souris ont été suivis chaque semaine pendant la RC. Les tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont été effectués avant et après les 4

semaines de RC. Des échocardiographies ont été effectuées avant et après la RC afin d'évaluer la fonction cardiaque *in vivo*.

La composition corporelle (pourcentage de masse grasse, de masse maigre et d'eau) a été mesurée chez les souris vigiles par la technique de résonance magnétique nucléaire avec l'appareil d'échoMRI700^{TM} (EchoMedical Systems, Houston, TX, USA) après 4 semaines de RC. A 7 mois, une partie des souris a été euthanasiée et les cœurs ont été isolés et perfusés selon la méthode Langendorff afin d'évaluer la fonction cardiaque *ex vivo* ainsi que la sensibilité aux lésions d'ischémie-reperfusion. Sur un autre groupe de souris, les muscles papillaires ont été prélevés et l'activité de la chaine respiratoire a été évaluée par respirometrie afin d'apprécier la fonction mitochondriale au sein du tissu cardiaque. Le plasma a été prélevé chez les souris à jeun et conservé à -80°C pour des dosages ultérieurs. Le ventricule gauche a été prélevé et un fragment (environ 10 mg) a été utilisé pour doser la production des radicaux libres par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), le restant a été congelé à -80°C afin d'effectuer les dosages d'expression protéique ou génique par Western blot ou PCR (Figure 8).

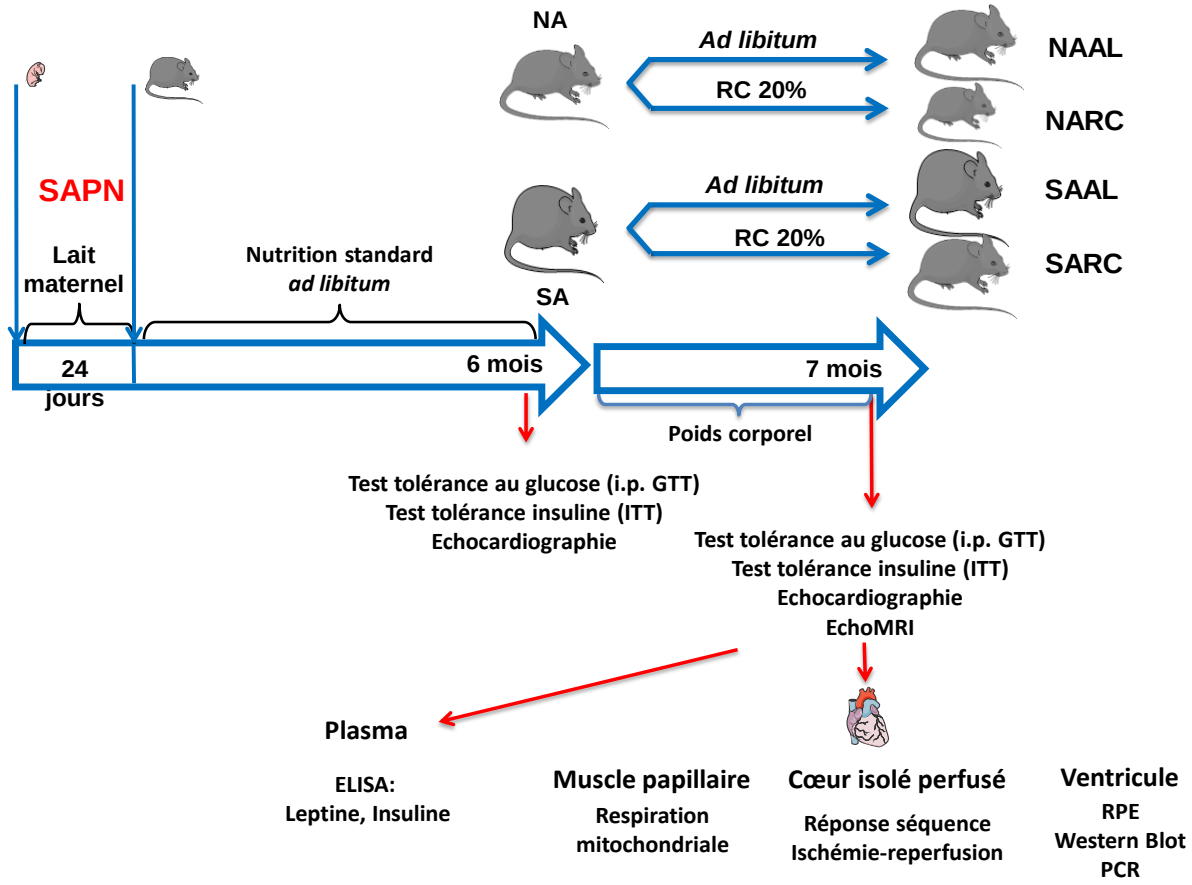

Figure 8 : Protocoles expérimentaux des souris

C. Mesure biochimiques plasmatiques

a) Glycémie

La glycémie a été mesurée chez les souris à jeun de 6 h sur des échantillons sanguins prélevés à la queue à l'aide d'un glucomètre et de bandelettes FreeStyle Optium (Abbott, USA). Les quantités d'insuline et de leptine plasmatiques ont été mesurées par technique immunoenzymatique de type « Enzyme-linked immunosorbent assay » (Mouse insuline ELISA kit: orb54818, Mouse leptine ELISA kit: orb79064, Biorbyt, United Kingdom,) selon le manuel fourni par le fournisseur.

b) Dosage de l'insuline

Une solution standard d'insuline était fournie dans le kit et la gamme réalisée était la suivante : 0 ng/ml, 0,025 ng/ml, 0,075 ng/ml, 0,2 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1,5 ng/ml. Un test a été réalisé préalablement afin de définir la dilution adéquate des échantillons : le plasma a été dilué au ½ et les dosages ont été réalisés en duplicate. 25 µl de plasma dilué ou de la solution standard ont été déposés dans les puits. La sensibilité minimale du dosage était de 0,025 ng/ml. Les plaques ont été lues selon une longueur d'onde d'absorbance de 450 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre multiplaque (Victor^{TM}, Multilabel Plate Readers, PerkinElmer).

L'insulinoresistance a été interprétée par l'indice HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance) selon la formule :

HOMA-IR = [(glycémie à jeun (mmol/L) * insulinémie (mU/L)]/22,5

c) Dosage de la leptine

Les standards ont été préparés à partir d'une solution mère fournie sous forme de poudre et reconstituée à 30 ng/ml, puis diluée afin d'obtenir des solutions allant de 1 ng/ml à 0 ng/ml afin de constituer la gamme étalon. La sensibilité minimale du dosage était de 4,1 pg/ml. Les échantillons plasmatiques ont été dilués au 1/20^{e} et 100 µl d'échantillons ou de solution standard ont été déposés dans les puits la veille du dosage et incubés pendant une nuit à 4°C. Les dosages ont été réalisés en duplicate et les plaques ont été lues selon une longueur d'onde d'absorbance de 450 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre multiplaque (VictorTM, Multilabel Plate Readers, PerkinElmer).

D. Tests tolérance au glucose et à l'insuline (GTT et ITT)

La tolérance au glucose est définie par la capacité d'un organisme à normaliser sa glycémie suite à une administration importante de glucose, par voie orale ou parentérale. Cette procédure met en jeu essentiellement : la capacité pancréatique de sécrétion d'insuline, la captation et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques et la stimulation du système nerveux autonome.

Le test de tolérance à l'insuline repose sur le suivi de la glycémie après injection d'une dose déterminée d'insuline. Ce test met en jeu la capacité des tissus à répondre l'insuline donc leur insulino-sensibilité.

Des tests de tolérance au glucose (2 g de glucose/kg poids corporel) et à l'insuline (0.75 UI d'insuline/kg poids corporel) ont été effectués après 6 heures de jeûne par une injection intrapéritonéale sur les souris vigiles. Les tests ont été effectués en respectant une période de deux jours d'intervalle, en commençant par le test de tolérance au glucose. La glycémie a été mesurée aux temps 0, 15, 30, 45, 60,75, 90, 105 et 120 minutes après l'injection de glucose ou d'insuline par un glucomètre avec les bandelettes FreeStyle Optium (Abbott, USA).

E. Evaluation de la fonction cardiaque

1. Méthode in vivo d'échocardiographie

L'échocardiographie (Vevo770^{TM}, VisualSonics Inc., Toronto, Canada), est une technique d'imagerie utilisant les ultrasons. Il s'agit d'une méthode *in vivo*, non invasive, d'exploration de l'état structurel, fonctionnel et hémodynamique du système cardiovasculaire. L'utilisation de l'échocardiographie transthoracique sur l'animal de petite taille, ayant une fréquence cardiaque élevée telle que la souris (450-500 bpm), a été rendue possible grâce au développement d'imagerie de haute performance utilisant des sondes de haute fréquences (30 MHz) et permettant d'obtenir des cadences élevées d'images.

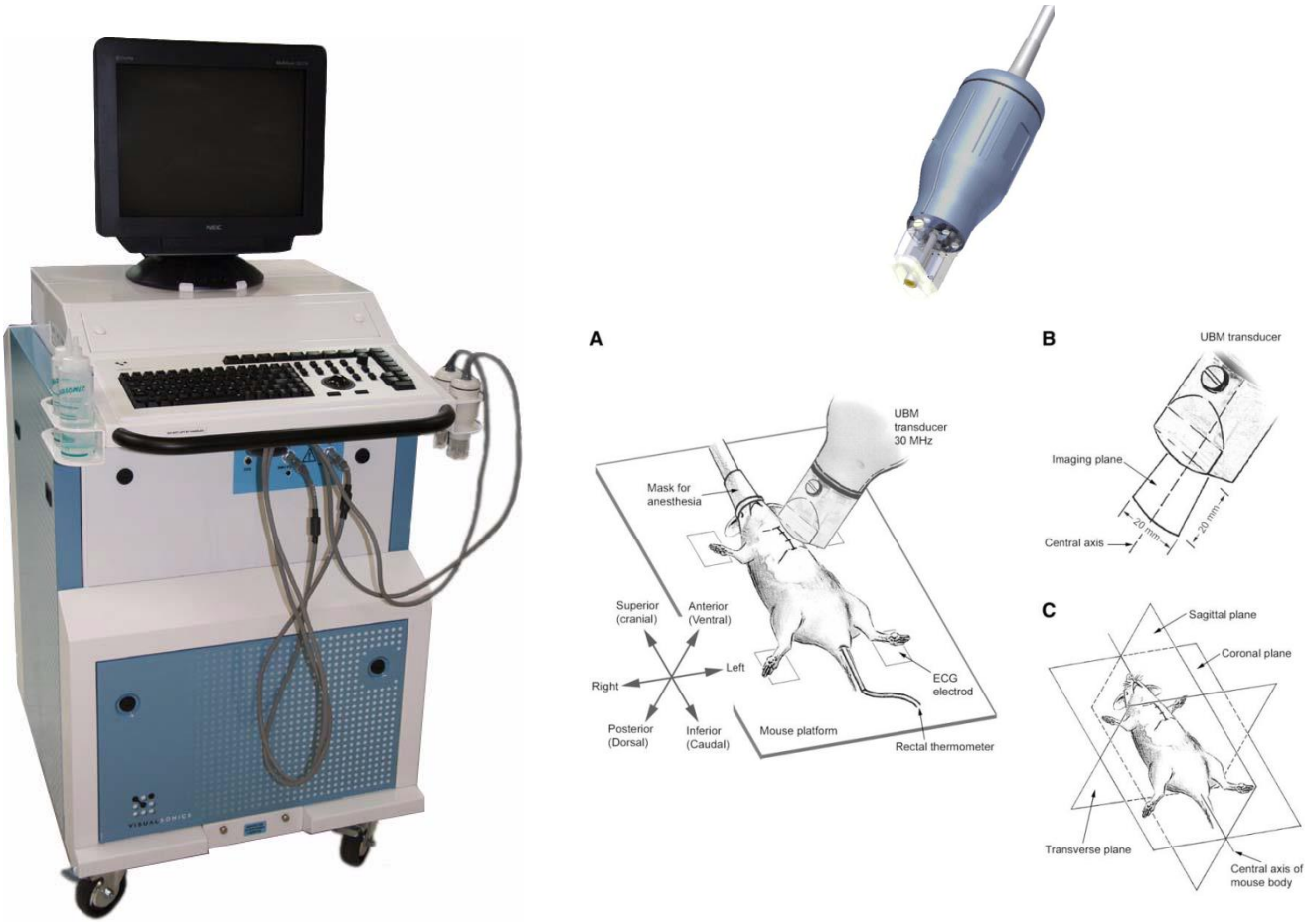

Figure 9 : Représentation schématique de l'installation de souris pour la réalisation de l'échocardiographie. D'après Zhou YQ et al., 2004

a) Principe de formation de l'image

L'ultrason : Il s'agit d'une onde sonore qui se propage dans un milieu sous la forme d'une série d'ondes représentées par une sigmoïde. L'ultrason est sous la dépendance de 3 paramètres : sa vitesse de propagation V, sa fréquence F et sa longueur d'onde λ, liées par l'équation V = λ * F. Les ultrasons possèdent de très hautes fréquences de l'ordre de millions de cycles par seconde ou mégahertz (2 à 7 mégahertz), bien supérieures à celles audibles par l'oreille humaine.

Production et réception de l'ultrason : La sonde contient un cristal possédant des propriétés piézo-électriques c'est-à-dire capable de se déformer, de vibrer et d'émettre des ultrasons sous l'action d'un champ électrique. Lorsqu'ils rencontrent les tissus, les ultrasons sont réfléchis et renvoient un signal

appelé écho. La somme des amplitudes des échos recueillis par la sonde est traduite par l'appareil en un certain niveau de gris et permet de reconstruire une image anatomique fidèle de la zone explorée, et reproduit l'aspect du cœur en mouvement. Cette image est visionnée sur un écran vidéo.

b) Réalisation de l'examen échocardiographique

La souris est maintenue anesthésiée tout au long de l'examen au moyen d'un gaz volatil halogéné (isoflurane) administré à l'aide d'un masque délivrant un mélange isoflurane/air (3/1,5). Cette anesthésie semble la mieux tolérée, en particulier chez la souris, induisant peu d'effets hémodynamiques. Puisque la propagation des ondes dans l'air est très mauvaise, il est nécessaire de raser soigneusement le thorax de l'animal afin de placer la sonde en contact étroit avec la peau. Ensuite, la souris est placée en position de décubitus dorsal sur une plate-forme et chauffée avec une lampe rouge afin de maintenir sa température corporelle à 37°C -38°C. Un gel de contact est appliqué sur le thorax pour éliminer la couche d'air qui s'intercale entre la sonde et la peau et qui pourrait engendrer une atténuation importante du signal entre l'émission et la réception des ultrasons par la sonde. La fréquence de l'onde ultrasonore influence la résolution et la pénétration de l'onde : plus la fréquence est élevée, meilleure est la résolution et plus faible est la pénétration de l'onde, ce qui permet d'examiner les structures proches de la peau, comme c'est le cas pour l'étude du cœur chez le petit animal. Ainsi, pour l'exploration échographique du cœur de souris, une sonde de fréquence de 30 MHz a été utilisée, permettant d'obtenir une excellente imagerie avec une analyse précise et complète des parois ventriculaires antérieures et postérieures.

c) Paramètres fonctionnels cardiaques mesurés in vivo

Les paramètres cardiaques ont été étudiés en mode temps mouvement (TM) et après avoir gelé l'image :

- Les dimensions du ventricule gauche ont été analysées par la mesure des diamètres télédiastoliques (DTD, en mm) et télésystoliques (DTS, en mm). Cette mesure nécessite la plus grande attention en raison de l'interposition de piliers et cordages.
- La fréquence cardiaque (FC, en bpm) a été déterminée par l'intégration de 3 oscillations.
- La fonction systolique ventriculaire a été déterminée par le calcul de la fraction de raccourcissement (FR, en %), selon l'équation qui rapporte la différence diastolo-systolique de la dimension du ventricule gauche à sa valeur diastolique : FR= [(DTD-DTS)/DTD]*100.

- Lorsque la dimension ventriculaire est un volume, la fraction de raccourcissement correspond à la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) déterminée par l'équation FEVG = [(VDT-VTS)/VTD]*100, où VTD représente le volume télédiastolique et VTS le volume télésystolique. Dans cette étude, VTS et VTD ont été déterminés par la méthode de Teicholz en utilisant les formules suivantes :

VTD = [7* (DTD) ^{3}] / (2,4 + DTD)

VTS = [7* (DTS) ^{3}] / (2,4 + DTS)

2. Méthode ex vivo de cœur isolé perfusé en mode Langendorff

La technique Langendorff permet de perfuser et de maintenir la viabilité d'un cœur isolé afin d'étudier la fonction cardiaque en dehors de l'organisme.

a) Principe

Les souris ont été anesthésiées par du pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) mélangé avec de l'héparine (500 IU/kg, i.p.). Après perte totale des réflexes nociceptifs, le cœur a été prélevé et placé dans un bain de liquide de perfusion glacé jusqu'à cessation des battements. Il a été ensuite immédiatement perfusé *ex vivo* à pression constante (75 cm H_2O) par voie aortique rétrograde selon la méthode décrite par Langendorff en 1895, au moyen d'un liquide de perfusion de type Krebs Henselheit.

b) Milieu de perfusion

Le liquide de perfusion de Krebs-Henselheit modifié (pH 7,4) était thermostaté à 37°C, saturé en oxygène par un mélange O_2/CO_2 (95% / 5%) et sa composition était la suivante : 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 25 mM $NaHCO_3$, 1,2 mM KH_2PO_4, 1,2 mM $MgSO_4/7H_2O$, 2,5 mM $CaCl_2/2H_2O$ et 11 mM glucose. Le liquide a été filtré sous vide (filtre Millipore 0,45 µm) afin d'éliminer d'éventuelles particules qui pourraient obstruer le réseau capillaire coronaire.

c) Paramètres fonctionnels cardiaques ex vivo

Le cœur n'etait pas stimulé électriquement (pacing) et se contractait selon la fréquence de dépolarisation spontanée du nœud sinusal. La pression intraventriculaire gauche a été mesurée via un ballonnet en latex introduit dans le ventricule gauche à travers la valve mitrale par une incision du toit de l'oreillette gauche, et relié à un capteur de pression. Le ballonnet a été rempli par de l'eau distillée afin d'obtenir une pression intraventriculaire télédiastolique comprise entre 4 et 10 mmHg.

Les enregistrements continus de la pression exercée par le myocarde sur le ballonnet inséré dans le ventricule gauche ont été réalisés par système LabChart (PowerLab®, LabChart® System, ADInstruments, Paris, France) et ont permis de recueillir en même temps les paramètres fonctionnels suivants :

- La fréquence cardiaque (FC, en bpm)
- La pression développée par le ventricule gauche (PDVG, en mmHg) calculée à partir des pressions intraventriculaires gauches : pressions télédiastolique (PTDVG) et télésystolique (PTSVG) selon l'équation PDVG = PTSVG – PTDVG,
- La vitesse de contraction (+dP/dT) et la vitesse de relaxation (-dP/dt), index de l'efficacité contractile et de relaxation du myocarde, ont été calculés par le même logiciel.

Le recueil des effluents coronaires régulièrement au cours de la perfusion a permis la détermination du débit coronaire (DC, en ml/min).

d) Protocole de perfusion

Tous les cœurs isolés ont été perfusés pendant une phase de stabilisation de 15 minutes et puis pendant 10 minutes afin d'obtenir les paramètres fonctionnels de base. Ensuite, une ischémie globale totale normo-thermique de 30 minutes a été induite en arrêtant la perfusion de liquide de Krebs. Au bout de 30 minutes d'ischémie, les cœurs ont été reperfusés pendant 2 heures. A la fin du protocole, la nécrose du cœur a été évaluée par la mesure de la taille d'infarctus après marquage au 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma).

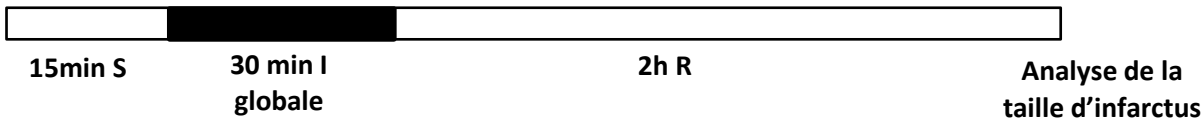

Figure 10 : Protocoles expérimentaux pour l'étude de sensibilité cardiaque aux lésions d'ischémie (I)-reperfusion (R) après une période de stabilisation (S) initiale

F. Analyse du stress oxydant cardiaque par RPE

La spectroscopie de RPE est une des seules méthodes d'identification et de quantification directe des radicaux libres. En raison de l'importante réactivité de ces espèces et de leur éventuellement demi-vie très brève, de nombreux composés radicalaires ne peuvent être identifiés par RPE qu'après stabilisation par le froid ou par des composés piégeurs appelés « spin-trap ».

Après l'euthanasie des souris, le cœur a été immédiatement perfusé avec une solution glacée de Krebs-Henselheit afin d'éliminer au maximum le sang. Un fragment du cœur de diamètre 3 mm a été prélevé, pesé puis nettoyé dans du tampon Krebs-HEPES spécifique pour RPE (pH 7,4) contenant 25 mM deferroxamine et 5 µM diethyl-dithiocarbamate afin d'eliminer toute trace de métaux. Ensuite le tissu (environ 10 mg) a été incubé dans 100 mM de 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine (CMH) pendant exactement 15 min à 37°C. En présence d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, l'hydroxylamine CMH s'oxyde en radical nitroxyde $CP^{\bullet}$. Après incubation, le tampon et le tissu ont été transférés dans un cathéter en polyethylène de 20 cm de long, immédiatement congelé dans l'azote liquide et stocké à – 80°C afin d'être analysé ultérieurement par RPE à 100 K. La congélation des tissus cardiaques ainsi que leur analyse à basse température permet en effet de stabiliser le radical $CP^{\bullet}$ formé.

Les échantillons tissulaires congelés ont été introduits dans la cellule en quartz d'une cavité de haute sensibilité (HS) et les spectres RPE du radical $CP^{\bullet}$ ont donc été enregistrés à 100 K au moyen du spectromètre de RPE de bande X EMX 100, muni d'un Dewar (Bruker, Wissembourg, France). L'intensité du pic de haut champ du spectre caractéristique du radical $CP^{\bullet}$ déterminé à basse température a été mesurée et exprimée en fonction du poids du fragment tissulaire cardiaque étudié.

G. Evaluation de la fonction mitochondriale au niveau du tissu cardiaque

a) Principe

Les études de respiration mitochondriale ont été effectuées grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. Corinne Leloup, du Centre des Sciences du Goût de l'Alimentation de Dijon (UMR INRA CNRS 1324), qui nous a permis d'accéder à leur appareillage et de réaliser les manipulations sous leur expertise. Un oxygraphe polarographique de haute résolution (Oroboros Oxygraph-2k, Innsbruck, Austria) permet la mesure et le suivi au cours du temps de la concentration en oxygène contenue dans un milieu liquide. La partie essentielle de l'appareil est l'électrode qui est composée d'une anode d'argent et d'une

cathode en or, toutes deux reliées par un pont de 1 mM de KCl et séparées d'une membrane de téflon perméable à l'oxygène. Le courant électrique produit est proportionnel à la concentration en oxygène dissout. La variation de concentration en oxygène dans la solution produit une variation d'intensité du courant mesurable à l'aide d'un enregistreur. Chaque jour d'expérience, l'électrode est calibrée (concentration de 0 et de 100% d'oxygène). Toutes les mesures oxygraphiques sont réalisées à 37°C dans une solution MiR06Cr (mitochondrial respiration media).

b) Solution

MiR06Cr : 0,5 mM EGTA, 3 mM $MgCl_2/6H_2O$, 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO4, 20 mM HEPES, 110 mM D-sucrose, 1 g/l BSA sans acide gras essentiels, 280 U/ml catalase, 20 mM creatine, pH 7,1

BIOPS: 2,77 mM CaK_2EGTA, 7,23 mM K_2EGTA, 5,77 mM Na_2ATP, 6,56 mM $MgCl_2/6H_2O$, 20 mM taurine, 15 mM Na_2phosphocreatine, 20 mM imidazole, 0,5 mM DTT, 50 mM MES hydrate, pH 7,1

c) Préparation des muscles papillaires

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et le cœur récupéré immédiatement. Les muscles papillaires, de diamètre de 1-1,5 mm, de longueur de 2-4 mm, et d'un poids de 3-4 mg ont été prélevés et puis mis dans une solution BIOPS à 4°C. Les fibres ont été séparées les unes des autres en les écartant avec des pinces courbes fines, non aimantées et aux extrémités fines, dans la solution BIOPS à 4°C. Ensuite, les fibres ont été perméabilisées dans la solution BIOPS supplémentée avec 50 µg/ml de saponine pendant 20 min à 4°C et sous agitation légère. Le but de la perméabilisation est de permettre l'accès des métabolites vers les mitochondries, afin d'étudier la régulation de la respiration mitochondriale. La saponine (détergent) est utilisée comme agent de perméabilisation en raison de sa forte affinité pour le cholestérol contenu en grande quantité dans le sarcolemme. Dans ces conditions, la membrane externe mitochondriale reste intacte car elle ne contient pas ou très peu de cholestérol. Après la perméabilisation, trois lavages de 10 minutes dans la solution Mir06 (4°C et sous agitation légère) ont été effectués afin d'éliminer la saponine et de stopper la perméabilisation.

d) Protocole de titration des substrats ou des inhibiteurs

Les analyses ont été effectuées dans des chambres oxygraphiques thermostatées. La décroissance de la concentration d'oxygène dans les chambres a été mesurée afin de calculer la vitesse

de consommation d'oxygène pour les différentes chambres, qui représente un reflet de l'activité de la chaîne de respiration mitochondriale. La mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale est exprimée en nmol d'oxygène / min / mg de tissue. Différents substrats ont été introduits après une période basale de respiration pour activer les différents complexes de la chaîne de respiration mitochondriale :

- Les substrats permettant la génération de NADH, équivalent réducteur apportant ses électrons au complexe I, ont été introduits : glutamate (10 mM), malate (2 mM) et pyruvate (5 mM). La consommation d'oxygène ainsi mesurée correspond à l'activité de base de la chaîne de respiration mitochondriale au travers des complexes I, III et IV (V_{CI}).
- Ensuite, l'adjonction de succinate (10 mM), substrat qui va générer du $FADH_2$ grâce à la succinate déshydrogénase, va permettre de stimuler la chaine respiratoire à partir du complexe II, (activation des complexes II, III et IV (V_{CII})).
- L'adjonction de l'ADP (2,5 mM), permet une stimulation maximale de la chaîne de respiration mitochondriale au travers de tous ses complexes, et surtout du complexe V (Etat 3 : respiration au couplage maximal).
- L'adjonction de carboxyatractyloside (0,75 mM) va bloquer le complexe V et l'ATP synthase va atteindre à l'état 4 de la respiration, c'est-à-dire la respiration non couplée).

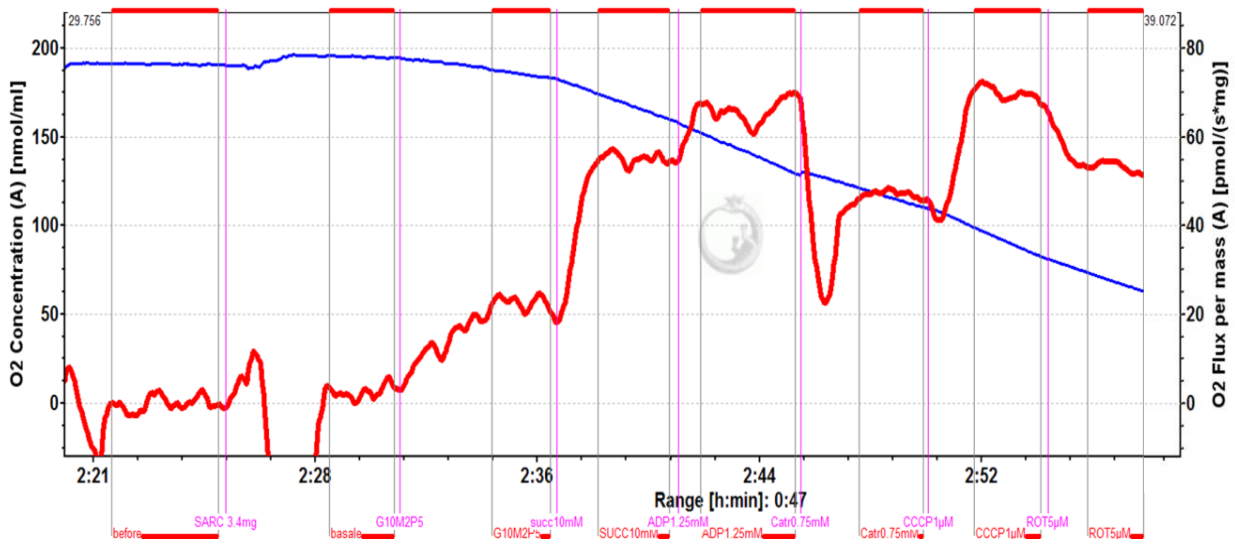

Figure 11 Tracé oxygraphique.

La courbe en bleu et l'échelle de gauche montre la consommation de l'O2 et la courbe rouge avec l'échelle de droite montrent le flux d'O2 (la consommation divisée par le temps)

H. RT-PCR en temps réel

L'analyse de l'expression cardiaque de gènes d'enzymes antioxydantes, telles que la MnSOD, la Cu/ZnSOD, la catalase, d'un marqueur de remodellage cardiaque : la βMHC, du substrat du récepteur à l'insuline (IRS), et d'un transporteur de glucose (Glut4) ont été réalisées par une technique de biologie moléculaire, la RT-PCR (Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction) en temps réel.

a) Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits grâce à l'utilisation d'un kit d'extraction (RNAeasy Mini kit, QIAGEN, France). Environ 50 mg de tissus ont été lysés mécaniquement à 4°C dans une solution de Qiazol à l'aide d'un homogénéisateur (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). Du chloroforme a été ajouté à l'homogénat, qui a été centrifugé (12 000 g, 15 min, 4°C), afin de séparer les ARN des protéines et autres contaminants. La phase aqueuse a été récupérée et additionnée à de l'éthanol à 100 % (vol/vol). La solution a été déposée sur une colonne permettant la fixation sélective de l'ARN après centrifugation (8 000 g, 15 s). Des lavages successifs par le tampon RWT et le tampon RPE suivis de centrifugation (8 000 g, 15 s) ont été appliqués afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Une élution a été réalisée par dépôt de 60 µl d'eau sans RNAse sur la colonne, suivie d'une centrifugation (8 000 g, 1 min). Les ARN ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à leur analyse.

Les ARN totaux extraits ont été dosés par spectrophotométrie avec un spectrophotomètre (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). La mesure de l'absorbance a été effectuée sur un intervalle allant de 220 à 350 nm de longueur d'onde, car la longueur d'onde 260 nm correspond à l'absorption maximale des acides nucléiques. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 ng d'ARNs totaux/µl. Les ratios 260/280 et 260/230 sont également donnés par l'appareil afin de mesurer la pureté des échantillons.

b) Transcription inverse

La transcription inverse (RT) est la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir des ARNs totaux extraits. Le principe repose sur l'utilisation d'oligo-dT qui se lient aux ARNs et servent d'amorces pour une ADN polymérase ARN-dépendante. En présence de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), les amorces sont allongées ce qui permet la synthèse d'ADNc représentatifs de l'ensemble des ARNs. La réaction a été réalisée grâce à un kit (M-MLV Reverse Transcriptase, Invitrogen™, Life Technologies, Saint-Aubin, France) dans un volume total de 10 µl. Le mélange contenait

1 µg d'ARN, 1 µl de Random Primers 50 µg/ml (InvitrogenTM, Life Technologies, France), 1 µl de dNTP 10 mM (InvitrogenTM, Life Technologies, France). Le mélange a été chauffé à 72°C pendant 5 minutes, puis mis sur la glace pendant au moins une minute. A ce mélange ont été ajoutés 8 µl d'un mix contenant 4 µl du tampon First-Strand 5X, 2 µl de DTT, 1 µl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen™, Life Technologies, Saint-Aubin, France) et 1 µl de la M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Life Technologies, Saint-Aubin, France). La réaction de RT a été réalisée selon le protocole suivant : 60 minutes à 37°C et 15 minutes à 70°C. Les produits ont été conservés à -20°C en attendant leur utilisation pour la PCR (polymérisation en chaîne à temps réel).

c) Réaction de polymérisation en chaine (PCR) quantitative en temps réel

(1) Principe de qPCR

Le principe de la réaction de la PCR consiste à amplifier spécifiquement et en quantité très importante une séquence d'ADN d'intérêt. L'amplification repose sur la répétition d'un certain nombre de cycles (30 à 50 fois) constitués de 3 étapes : (1) dénaturation c'est-à-dire séparation des doubles brins d'ADNc, (2) hybridation des amorces, spécifiquement sélectionnées, sur la séquence d'intérêt, et (3) élongation des brins complémentaires grâce à l'activité d'une enzyme de polymérisation permettant de synthétiser la totalité de l'ADN sous forme double brin. A la différence d'une PCR classique, la PCR quantitative en temps réel est basée sur la mesure quantitative de la fluorescence émise par un fluorophore qui s'intercale entre les brins de l'ADN néosynthétisé au cours de la réaction de PCR.

Le fluorophore utilisé au cours de cette réaction est le SYBR®Green et qui est fluorescent uniquement lorsqu'il est lié à de l'ADN double brin. En solution, présente sous sa forme libre, la molécule de SYBR Green est peu fluorescente alors que lorsqu'elle est fixée sur le petit sillon de l'amplicon, elle émet une fluorescence 250 fois plus intense, à une longueur d'onde d'émission (λem) de 521 nm et une longueur d'onde d'excitation (λexc) de 494 nm. Au cours de l'étape d'hybridation et d'élongation, le nombre de molécules de SYBR Green liées à l'amplicon augmente, ce qui se traduit par une augmentation du niveau de fluorescence, quantifiée en continu en fin de phase d'élongation de chaque cycle d'amplification, d'où le terme « temps réel », grâce à un microspectrofluorimètre couplé à l'appareil de PCR. L'intensité de fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons formés au cours de la réaction et donc à la quantité initiale d'ADNc d'intérêt.

Les séquences des amorces sens et anti-sens utilisées pour amplifier spécifiquement les gènes d'intérêt ainsi que celles du gène de référence, HPRT, ont été obtenues à partir de la base de donnée Primerbank (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/) et sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR

Gene	Amorce sens (5' to 3')	Amorces anti-sens (5' to 3')
HPRT	CTGGTGAAAAGGACCTCTCG	TGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCA
MnSOD	AACTCAGGTCGCTCTTCAGC	GCTTGATAGCCTCCAGCAAC
Cu/ZnSOD	CTGCTCGCTCACATAACAGC	ATGGCTGAGGTTCTCTGCAC
Catalase	GATGAAGCAGTGGAAGGAGC	ACCACATCCTGAACGAGGAG
βMHC	GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC
IRS1	CCCGTTCGGTGCCAAATAGC	GCCACTGGTGAGGTATCCACATAGC
Glut4	CCAGTATGTTGCGGATGCTA	GAAGGCAGCTGAGATCTGGT

(2) Réaction de qPCR

Cette méthode de qPCR en temps réel nécessite le calibrage de la réaction et de l'appareil par l'amplification d'une gamme de dilution des ADNc. Des dilutions en série sont réalisées à partir d'un mélange de tous les produits de RT dilué au 1/10^{e} afin de constituer la gamme étalon.

Chaque échantillon est analysé en triplicate dans des plaques 96 puits (Applied Biosystem ®, Life Technologies, USA). Le volume réactionnel dans chaque puits est de 20 µl et est constitué de la manière suivante : 10 µl de SYBR Green 2X (Applied Biosystem ®, Life Technologies, USA), 2 µl d'ADNc dilué à 1/10, 500 µM de chaque amorce (Applied Biosystem ®, Life Technologies, Saint-Aubin, France), et un volume d'eau DEPC (Ambion, Life technologies, life Technologie, USA) pour compléter à 20 µl.

La réaction de qPCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems®, Life Technologies, Saint-Aubin, France) et débute par une étape de chauffage à 95°C pendant 10 minutes, puis est suivie de 40 cycles, comprenant une dénaturation de 15 secondes à 95°C et une hybridation-élongation de 1 minute à 60°C. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C ce qui dénature l'ADN double brin, puis la température est

diminuée à 55°C, ce qui provoque la renaturation de l'ADN. La température est alors augmentée lentement de 55°C à 95°C par paliers de 0,5°C toutes les 10 secondes. La fluorescence est lue en continu.

Lors de la dernière étape, lorsque la température augmente, l'ADN double brin se dissocie peu à peu et les molécules de SYBR Green sont progressivement libérées, diminuant la fluorescence détectée. La température à laquelle 50% de l'ADN double brin est dénaturé correspond à la température de fusion (Tm : melting temperature) du produit synthétisé et est spécifique à chaque produit. Pour l'amplification spécifique d'un gène donné, un seul pic doit être observé sur la courbe de fusion.

L'utilisation de standards de réaction permet d'établir la droite d'étalonnage indiquant l'efficacité de la réaction pour chaque couple d'amorces, essentielle à la quantification. Ce facteur correspond à la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification. Pour que la PCR soit interprétable, l'efficacité doit être comprise entre 85 et 105%. La droite d'étalonnage représente les valeurs de Ct (« cycle threshold » ou cycle seuil) obtenues expérimentalement en fonction du logarithme des concentrations en ADNc fixées, issues de la série de dilutions des standards. La valeur de Ct est inversement proportionnelle au logarithme de la concentration initiale en ADNc. Le Ct est le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne le seuil de détection de l'appareil.

d) Traitement des résultats

Afin d'assurer la qualité et la fiabilité des résultats, les conditions d'intérêt sont testées en triplicate. L'efficacité doit être dans la plage citée plus haut et l'écart entre les duplicats doit être de moins de 1 Ct. L'analyse est ensuite effectuée avec le logiciel. Les Cts du gène d'intérêt sont normalisés à partir des gènes HPRT. La méthode comparative $2^{-\triangle\triangle Ct}$ a été utilisée pour analyser les résultats.

I. Western blotting

Le Western blot est une technique biochimique qui repose initialement sur la séparation de protéines selon leurs poids moléculaires, en se basant sur le principe de l'électrophorèse. L'électrophorèse correspond à la migration de particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique, ceci se faisant au travers d'un gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulfate (SDS). On parle alors de SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

Ensuite, le transfert des protéines contenues dans le gel vers une membrane est réalisé. Pour cela, le gel est mis en contact avec une membrane de PVDF (Polyvinylidène difluoride, Polyscreen Dupont, Bio-Rad, Hercules, USA) et un courant allant du gel vers la membrane permet de fixer les protéines contenues dans le gel sur cette membrane. La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire capable de reconnaître la protéine recherchée et de la fixer, puis un anticorps secondaire marqué à la peroxydase a été ajouté au milieu afin qu'il puisse se fixer sur le premier anticorps. La membrane est alors incubée avec du luminol qui est dégradé par la peroxydase. Cette réaction libère de l'énergie lumineuse qui est détectée par un appareil de mesure.

a) Extraction des protéines

Pour l'extraction des protéines, les VG ont été broyés à 4°C dans un tampon de lyse RIPA (10 µl pour 1 mg tissu) à l'aide d'un homogénéisateur (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). Les homogénats ont été incubés sur glace pendant 30 minutes et centrifugés à 5 000 g pendant 15 min à 4°C. La solution de surnageant contient alors les échantillons protéiques.

D'autre part, une gamme étalon d'une concentration en protéines allant de 0 µg/ml à 1 mg/ml, a été réalisée à partir d'une solution de sérum d'albumine bovine. Les protéines ont été dosées selon la technique de Lowry en utilisant un kit de dosage protéique (Bio-Rad, USA).

b) Préparation des échantillons

40 µg de protéines ont été reprises dans un tampon dénaturant (2X Laemmli Sample Buffer ajoutant β-mercaptoéthanol, BioRad, France). Tous les échantillons ont ensuite été amenés à un volume identique en ajoutant le Laemmli 1X. Cette manipulation entraîne la suppression des structures secondaires, tertiaires et quaternaires des protéines permettant ainsi une fixation du tampon de charge

sur ces protéines, qui se retrouvent chargées négativement (transformation en anions). La migration électrophorétique se fait uniquement en fonction de la masse moléculaire de chaque protéine, étant donné qu'elles portent toutes la même charge. Ensuite les échantillons sont transférés sur glace afin de stopper la réaction.

c) *Séparation des protéines en SDS-PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophorèses)*

Des quantités équivalentes de protéines (40 µg) sont séparées selon leur masse moléculaire sur un gel de polyacrylamide. Ce gel de migration est composé de deux types de gel superposés : le gel de séparation de 8% à 12% d'acrylamide (selon le poids moléculaire de la protéine cible) et le gel de concentration de 4% d'acrylamide. Les échantillons protéiques et 5 µl de marqueur de poids moléculaires (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoFisher Scientific, France) sont déposés et concentrés dans le gel à 4% à 50 V pendant 30 minutes puis séparés à 120 V dans le gel de séparation en présence d'un tampon de migration (Tris Base 3,03 g ; glycine 14,4 g ; SDS 0,1% ; QSP 1000 ml H_2O).

d) *Transfert des protéines sur membrane*

Après leur séparation, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF en milieu liquide dans un tampon de transfert Tris/Glycine/Méthanol sous l'action d'un champ électrique de 100 V pendant 1 à 2 heures.

e) *Immunoblotting*

Les membranes obtenues ont ensuite été incubées dans une solution à 5% de lait délipidé (0,5 g Réglait + 10 ml TBS Tween) pendant une durée d'une heure. Parce que la membrane possède plusieurs sites de fixation, il est donc important de bloquer tous les sites de liaison non spécifiques avant d'exposer la membrane à un ligand précis. Cette étape va permettre la saturation de la membrane et par la suite une meilleure spécificité de la liaison anticorps/protéines à quantifier. Après le blocage de la membrane, 3 lavages de 10 minutes avec du TBS contenant 0,1% de tween 20 ont été effectués. La membrane est alors prête pour son incubation avec un ligand spécifique de la protéine à détecter. Les membranes sont ensuite incubées avec les anticorps primaires dirigés spécifiquement contre les protéines étudiées, et dilués dans une solution de TBS tween 0,1%, de 5% de lait délipidé sous agitation pendant une nuit à 4°C. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois, puis incubées pendant 1 heure à température ambiante (TA) en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP dilué aussi

dans TBS tween 0,1%, lait délipidé 5%. Les membranes sont lavées 3 fois comme décrit précédemment et sont révélées par chimioluminescence. La révélation est réalisée à l'aide d'un substrat à base de luminol (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Allemagne) et dans un imageur capturant le signal (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad, Hercules, USA). Le temps d'exposition de la membrane varie en fonction du signal obtenu de 1 à 15 minutes.

f) Stripping

Il est possible de révéler plusieurs protéines sur la même membrane (cas de la GAPDH, par exemple, afin de normaliser le signal). Dans ce cas, les membranes sont lavées 3 fois comme décrit précédemment et incubées avec un tampon dit de «stripping» en milieu acide (Glycine-HCl 25 mM, SDS 1%, pH 2) (permettant de dissocier l'anticorps primaire de son antigène) pendant 30 minutes à TA sous agitation. Après 3 lavages supplémentaires, les membranes sont à nouveau saturées et incubées avec d'autres anticorps primaires.

g) Traitement des résultats

Les bandes protéiques des protéines d'intérêt et de la β-actine ayant migré sont captées par l'imageur et intégrées par le logiciel associé Image Lab (Bio-Rad, Hercules, USA), permettant ainsi une analyse par densitométrie. Pour chaque échantillon, un ratio de la densité de la bande correspondant à la protéine d'intérêt par rapport à celle de la GAPDH est calculé.

J. Analyses statistiques

Les résultats obtenus de manière continue sont exprimés sous la forme d'une moyenne ± erreur standard à la moyenne et les valeurs obtenues de manière discontinue sont présentées sous la forme d'une médiane. L'analyse statistique des résultats est réalisée à l'aide du logiciel SigmaPlot™ (Systat Software Inc., San Jose, USA). Pour les variables continues, la distribution de la normalité a été testée par le test de Shapiro-Wilk. Les comparaisons entres les groupes SL et NL avant la RC ont été réalisées grâce à un test de t-student ou de Mann-Whitney. Les comparaisons entre les 4 groupes après la RC sont effectués par un test d'analyse de variance ANOVA à deux facteurs (facteur 1 : groupe, facteur 2 : régime). L'évolution des paramètres cardiovasculaires a été analysée par un test de variance ANOVA à 2

facteurs (facteur 1 : traitement, facteur 2 : temps) avec mesures répétées, complété si besoin d'un test post-hoc Tukey. Le seuil de significativité a été fixé à $p<0,05$.

IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS

A. Première partie : Effets métaboliques de la restriction calorique chez les souris ayant subi une suralimentation postnatale

1. Introduction

Nous ne rappelons dans cette introduction à nos travaux expérimentaux que les points nécessaires à notre argumentation ultérieure dans la discussion de nos résultats.

1) Certains travaux, effectués chez le rongeur, ont montré qu'une suralimentation postnatale (SAPN) induit des changements précoces et permanents du poids corporel, associés à des anomalies métaboliques et fonctionnelles telles qu'un déséquilibre de la balance glucose/insuline, une dyslipidémie et parfois, une augmentation de la pression artérielle à l'âge adulte.
2) Les travaux de l'équipe de Plagemann ont montré que la SAPN, induite par une réduction de la taille des portées, chez les rats, induit des changements immédiats et définitifs du fonctionnement des circuits hypothalamiques (Davidowa et al. 2004) impliqués dans le contrôle de la satiété et de la dépense énergétique 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 à une diminution des signaux anorexigéniques. Au niveau biochimique, les rats ayant subi une SAPN présentent une hyperglycémie à jeun, une hyperinsulinémie et une hyperleptinémie concomitantes à des résistances centrales et périphériques à ces hormones. D'autres travaux ont montré par la suite des modifications endocriniennes comme une augmentation des voies de synthèse des glucocorticoïdes (Boullu-Ciocca et al. 2005) et parfois de discrètes augmentations du niveau de pression artérielle (Plagemann et al. 1999, Boubred et al. 2007, Boubred et al. 2009, Kappeler et al. 2009, Habbout et al. 2012). De ce fait, le modèle de SAPN conduit à des altérations biochimiques et physiopathologiques qui se rapprochent de la définition donnée chez l'homme du syndrome métabolique.
3) Des études expérimentales et cliniques ont précisé qu'une restriction calorique (RC) sur plusieurs modèles expérimentaux entraine une perte de poids corporel et améliore les profils métaboliques (Speakman et al. 2011). En effet, une augmentation du niveau d'activité physique, combinée à des conseils nutritionnels et à une réduction des apports caloriques, constitue la première ligne de traitement recommandée par les directives internationales (Grundy et al. 2005). La question que nous nous sommes posée a été de savoir si à l'âge adulte, lorsque les désordres métaboliques sont installés, un ajustement de la consommation de nourriture par RC

pourrait améliorer non seulement le poids corporel mais aussi la fonction métabolique chez les animaux SAPN.

Pour ce faire, nous avons donc mis une partie des souris NA et SAPN âgées de 6 mois en RC modérée, correspondant à une réduction de 20%, pendant 4 semaines. Les poids des 4 groupes de souris ont été mesurés tous les semaines. La mesure de la composition corporelle et des tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont été effectués avant et après les 4 semaines de RC. Le plasma a été prélevé chez les souris à jeun afin d'évaluer la concentration d'insuline, de glucose et de leptine.

2. Résultats

a) Evolution du poids corporel

Les études ont été réalisées sur 5 séries consécutives de reproduction. Un exemple, correspondant à une de ces séries, d'évolution pondérale de souris témoins (NA) et de souris ayant subi une SAPN est représentée sur la figure 12.

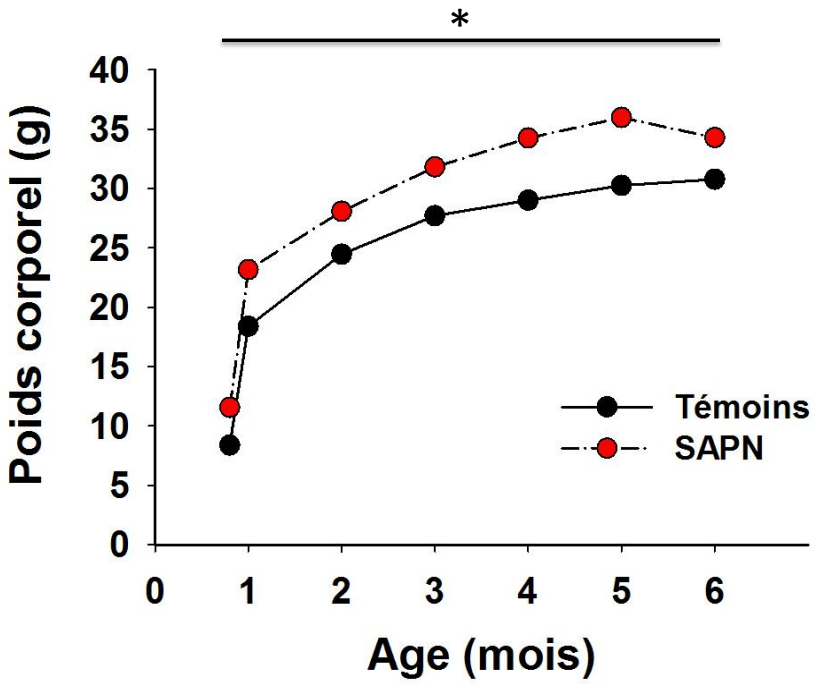

Figure 12 : Evolution de la masse pondérale au cours du temps au sein des 2 groupes expérimentaux. Les groupes normoalimentées (NA) et suralimentées (SAPN) pendant la période postnatale par réduction de la taille des portées (n=9 souriceaux par portée, vs. n=3 souriceaux par portée).* p<0,001

En fonction des séries de reproduction, qui variaient avec les différentes périodes de l'année, mais aussi avec l'âge des mères qui étaient mises en reproduction de l'âge de 6 semaines (primipares) à l'âge de 28 semaines (troisième et dernière reproduction, à l'issue de laquelle les mères étaient sacrifiées) les souris des portées SAPN présentaient une augmentation d'environ 20% à 30% de leur poids corporels au moment du sevrage. Après le sevrage, toutes les souris ayant été placées dans les mêmes conditions d'élevage en termes de nombre de souris par cage, et d'accès libre à une nourriture

standard et à l'eau, cette augmentation du poids corporel persistait chez les souris SAPN tout au long de leur maturation, mais à un niveau néanmoins inférieur à celui observé lors du sevrage.

Ainsi, à l'âge de 6 mois, les souris SAPN présentaient en moyenne une augmentation d'environ 16,9% de leur poids corporel. Après 4 semaines de RC, le poids corporel des souris des groupes NARC et SARC avait diminué de 15,5% par rapport à leurs groupes AL respectifs. De plus, le poids des souris SARC rejoignait celui des souris NAAL (Figure 13).

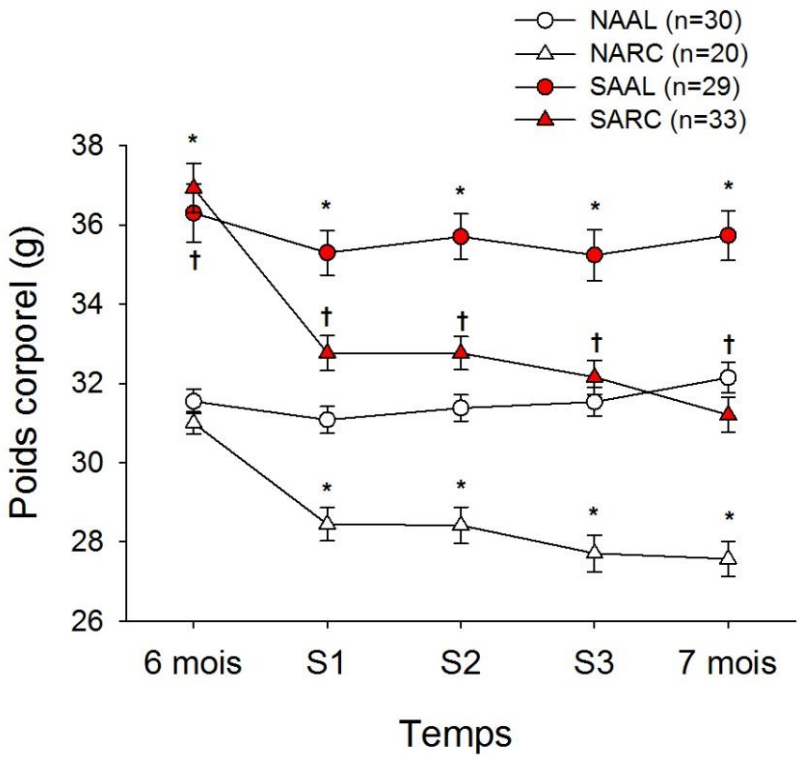

Figure 13 : Evolution de la masse pondérale pendant la période de restriction calorique au sein des quatre groupes expérimentaux.

* : significativement différent du groupe NAAL, P<0,001

† : significativement différent du groupe SAAL, P<0,001

NAAL : normoalimentée ad libitum

NARC : normoalimentée en restriction calorique

SAAL : suralimentée pendant la période postnatale ad libitum

SARC : suralimentée pendant la période postnatale en restriction calorique

b) Composition corporelle

A l'âge de 6 mois, la composition corporelle des souris a été mesurée par spectroscopie écho-MRI. Nous avons confirmé que l'augmentation du poids corporel chez les souris SAPN était reliée principalement à une augmentation de 52% du pourcentage corporel de masse grasse (12,8% vs 8,4%, $p<0,05$) (Figure 14).

Curieusement, après 4 semaines de RC, les souris SARC n'avaient pas réduit leur pourcentage de masse grasse (14,5% vs. 13,8%) alors que les souris NA soumises à une RC avaient, quant à elles, augmenté significativement leur pourcentage de masse grasse (6,3% vs. 11,0%). La perte de poids observée dans les groupes RC est donc à relier à une diminution de masse maigre (NARC : -1,70 g et SARC : -0,96 g, $p<0,05$), ou d'autres éléments de la composition corporelle (Figure 15).

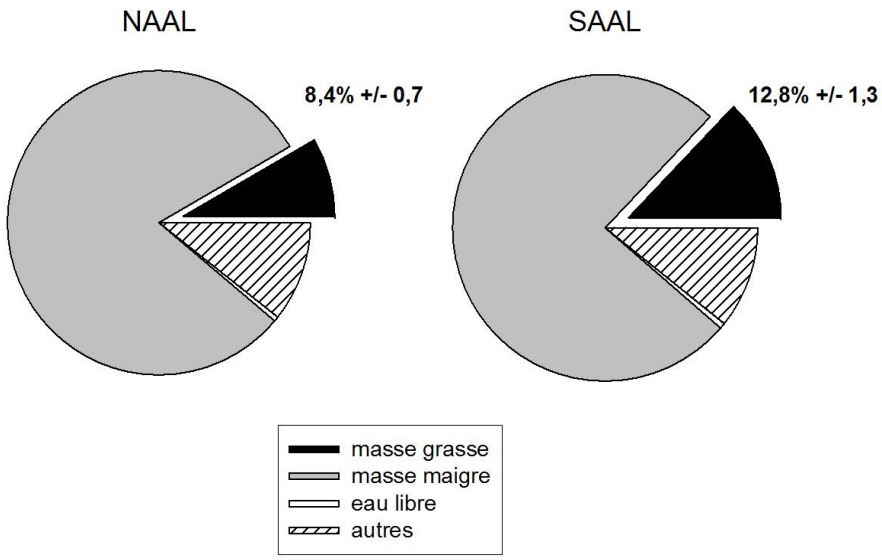

Figure 14 : Composition corporelle à l'âge de 6 mois au sein des deux groupes de souris
* : significativement différent du groupe NAAL, $p<0,05$

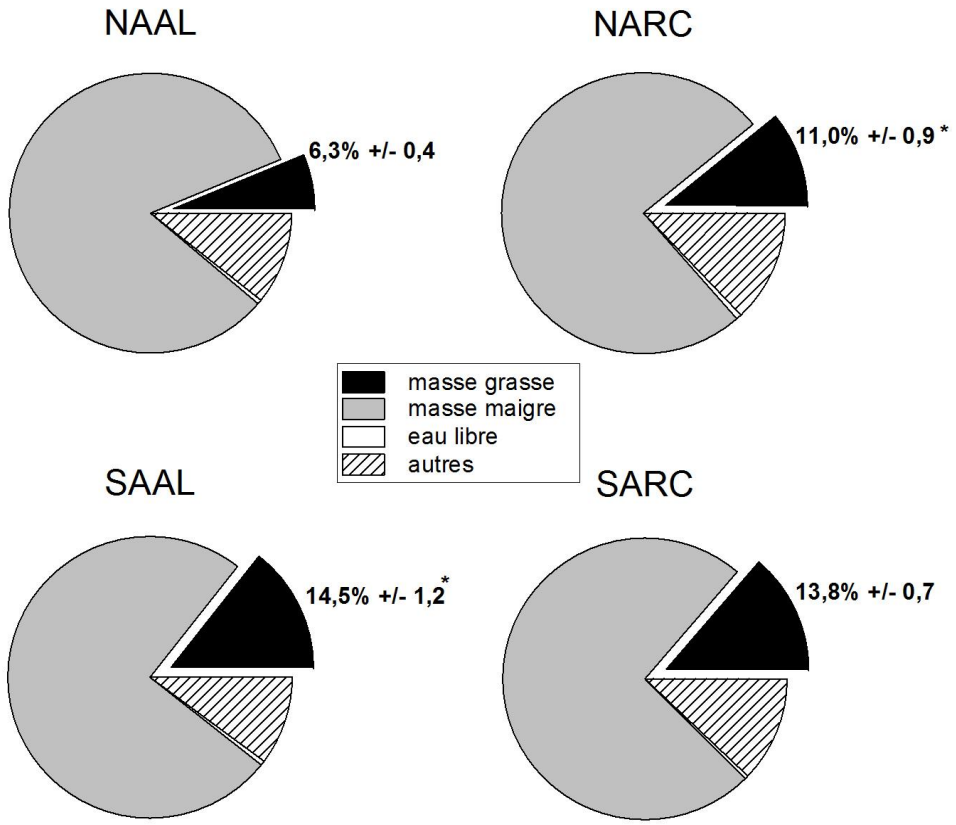

Figure 15 Composition corporelle à l'âge de 7 mois au sein des quatre groupes de souris
* : significativement différent du groupe NAAL, p<0,05

c) Evaluation des taux plasmatiques de glucose, d'insuline et de leptine :

A l'âge de 6 mois, il n'y avait pas de différence des niveau de glycémie à jeun entre les souris NA et SAPN (2,01 ± 0,06 vs. 2,09 ± 0,04 g/l). Néanmoins, après 4 semaines de RC, les valeurs de la glycémie avaient diminuées significativement dans les deux groupes de souris en RC par rapport aux groupes *ad libitum* (tableau 3).

Avant le régime, l'insulinémie des souris SAPN était significativement supérieure de 42% à celle des souris NA (1,56 ± 0,90 ng/ml vs. 0,98 ± 0,65 ng/ml, p=0,037). Un mois plus tard, et lorsque les souris continuent de s'alimenter *ad libitum*, l'insulinémie était toujours significativement augmentée chez les

souris SAAL par rapport aux souris NAAL (tableau 3). La RC a diminué l'insulinémie des souris du groupe SARC mais n'a pas eu d'effet dans le groupe des souris NARC.

L'indice HOMA-IR est souvent utilisé comme un index d'insulino-résistance. Nos résultats montrent que le groupe SAAL présentait une résistance à l'insuline, mais qu'après 4 semaines de RC, la sensibilité à l'insuline était restaurée dans le groupe SARC.

A l'âge de 7 mois, les souris SAAL présentaient des taux de leptine plus de deux fois supérieurs à ceux des souris NAAL. Après 4 semaines de RC, le taux de leptine n'était pas significativement modifié dans le groupe SARC, alors qu'il était étonnamment augmenté dans le groupe NARC par rapport aux valeurs de leurs témoins NAAL. La leptine étant issue majoritairement du tissu adipeux, ces résultats semblent cohérents avec les mesures de pourcentage de masse grasse des animaux.

Tableau 3 : Taux plasmatiques de glucose, d'insuline, de leptine et l'indice HOMA-IR au sein des quatre groupes d'animaux à l'âge de 7 mois.

	NAAL	NARC	SAAL	SARC
Glycémie (g/l)	1,98 ± 0,09 [a]	1,65 ± 0,011 [b]	1,99 ± 0,010 [a]	1,62 ± 0,09 [b]
Insuline (ng/ml)	0,98 ± 0,17 [a]	0,95 ± 0,06 [a]	1,59 ± 0,2 [b]	0,59 ± 0,17 [a]
HOMA-IR	11,40 ± 2,11 [a]	8,58 ± 1,50 [a]	17,18 ± 1,49 [b]	5,47 ± 1,43 [a]
Leptine (pg/ml)	62,8 ± 5,1 [a]	131,3 ± 18,1 [b]	151,8 ± 30,6 [b]	140,9 ± 16,7 [b]

d) Test Tolérance au glucose à 6 et 7 mois

Les tests de tolérance au glucose chez les souris vigiles de 6 mois ont confirmé que les souris SAPN présentaient une intolérance au glucose. Une augmentation significative de la glycémie était observée chez les souris SAPN par rapport aux souris NA 45 min et 60 min après l'injection du glucose (figure 16A). De plus, l'aire sous la courbe de la glycémie était plus importante chez les souris SAPN (figure 16B).

Après 4 semaines de RC, les souris SAAL restaient intolérantes au glucose. Au contraire, les souris SAPN sous RC amélioraient leur tolérance au glucose. Après injection de glucose, les glycémies de ce dernier groupe restaient plus basses que celles des autres groupes, et l'aire totale sous la courbe était significativement réduite. Toutefois, la RC n'avait pas d'effet sur l'évolution de la glycémie dans le groupe NARC.

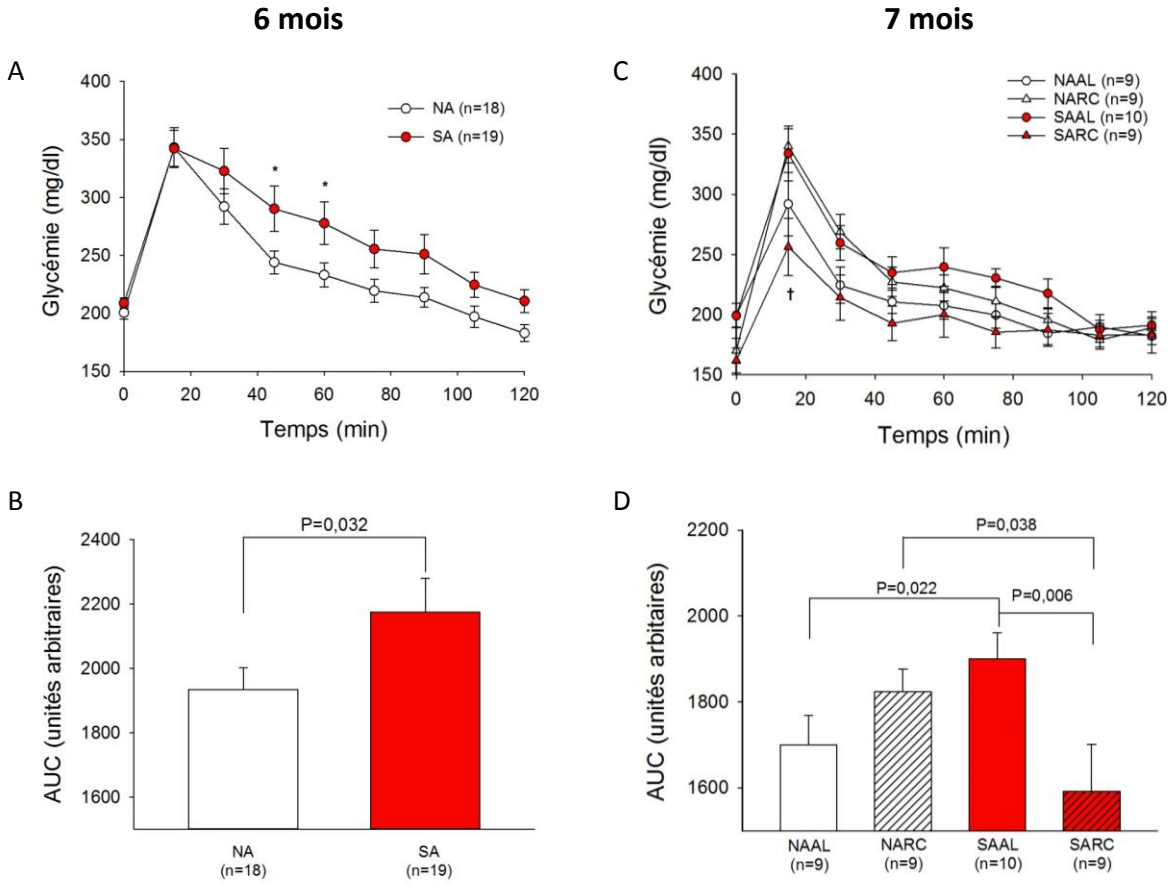

Figure 16 Evolution de glycémie et aire sous la courbe de la glycémie après injection de glucose (2 g/kg) avant (A, B) et après la RC (C, D).

* : significativement différent du groupe NAAL, p<0,05

† : significativement différent du groupe SAAL, P<0,001

e) Test de Tolérance à l'insuline à 6 et 7 mois

Afin d'évaluer la sensibilité à l'insuline dans les différents groupes de souris, un test de tolérance à l'insuline a été également effectué avant et après la RC. A l'âge de 6 mois, après une injection intra-péritonéale d'insuline, la glycémie du groupe SAPN restait légèrement plus haute que celle des souris NA, ce qui indique une résistance à l'insuline modérée dans ce groupe.

Après 4 semaines de RC, la sensibilité à l'insuline était non seulement restaurée mais même significativement accrue dans le groupe SARC, sans être modifiée dans le groupe NARC.

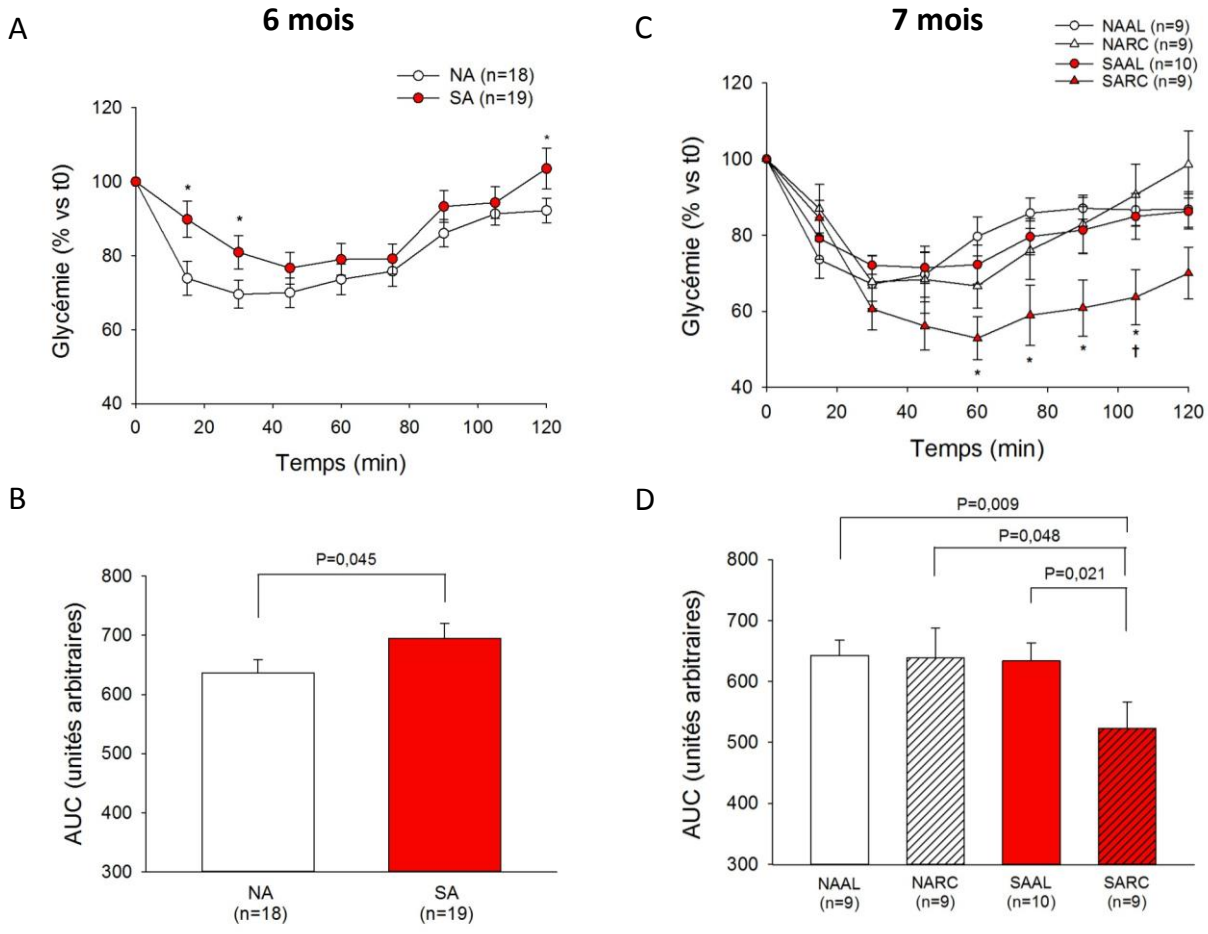

Figure 17 : Evolution de glycémie et aire sous la courbe de la glycémie après injection de l'insuline (0,75 UI/kg) avant (A, B) et après la RC (C, D).

* : significativement différent du groupe NAAL, p<0,05

† : significativement différent du groupe SAAL, P<0,001

3. Discussion

Dans la première partie de ce travail, nous avons confirmé que la SAPN induisait une augmentation significative du poids corporel au moment du sevrage, qui persistait, bien qu'à un niveau inférieur, à la maturation. Ce résultat est cohérent avec les travaux précédemment conduits dans notre équipe et dans d'autres. Cette augmentation du poids corporel est associée à une augmentation de la masse grasse, au détriment de la masse maigre (Habbout et al. 2013). En effet, une augmentation du tissu adipeux blanc viscéral est observée chez les rats au moment du sevrage et ultérieurement (Cunha et al. 2009, Rodrigues et al. 2011) et chez les souris SAPN (Glavas et al. 2010). Ces modifications s'accompagnent d'une augmentation de la surface des adipocytes (Boullu-Ciocca et al. 2005, Boullu-Ciocca et al. 2008, Hou et al. 2011). La masse grasse sous-cutanée est elle-aussi augmentée chez les souris SAPN jeunes mais pas chez les souris adultes (Rodrigues et al. 2011), ce qui indique que la persistance d'une adiposité supérieure à l'âge adulte chez les animaux SAPN est liée au maintien d'une quantité plus importante de la masse grasse viscérale.

De nombreux travaux de recherche ont mis en lumière le rôle de la leptine, une des adipocytokines les plus connues, dans la régulation de la prise alimentaire, des processus inflammatoires et des fonctions cardiovasculaires. Dans le cadre de notre travail de Thèse, nous avons mesuré le taux plasmatiques de leptine, et confirmé que la SAPN était bien accompagnée d'une augmentation systématique des taux de leptine circulante à l'âge adulte. L'hyperleptinémie observée chez les souris SAPN est corrélée à l'augmentation de leur masse grasse, et peut ainsi s'expliquer par une production et libération majorées de leptine par les adipocytes. Par ailleurs, l'augmentation des taux circulants de glucocorticoïdes, observée chez les rats SAPN (Boullu-Ciocca et al. 2005), pourrait participer aussi à stimuler la sécrétion de leptine au niveau du tissu adipeux (Slieker et al. 1996).

La RC est définie par une diminution de la prise alimentaire, mais sans engendrer à une malnutrition. Chez les rongeurs, une RC de moins 40-50% est considérée comme une RC sévère et souvent utilisée pour les études s'intéressant à la longévité des animaux. Une RC de moins 20-25% est considérée comme une RC modérée (Rohrbach et al. 2014). La RC modérée (moins 20%) utilisée dans notre travail a diminué le poids corporel dans les deux groupes de souris : SAPN et NA. Toutefois, il n'a pas induit le même effet sur le tissu adipeux dans les deux groupes. Après 4 semaines de RC, le pourcentage de masse grasse chez les souris SARC restait stable alors que celui des souris NARC augmentait de manière significative. Cette constatation est inattendue, car elle suggère que, pendant une RC modérée chez la souris, le tissu adipeux est conservé et que la perte de poids est plutôt due à une réduction de la masse maigre, d'eau ou d'autres composants tissulaires. Les taux de leptine

circulants (stables pour les souris SARC et augmentés pour les souris NARC), dépendants du niveau d'adiposité, corroborent ce résultat. D'autres études qui ont montré une diminution de la masse grasse induite par la RC reposaient sur des niveaux de RC plus sévères (souvent une RC de moins 40%) et plus longs (> 3 mois) que ceux de notre travail (Bagga et al. 1995, Han et al. 2012). Ceci suggère que les conditions de RC modérée utilisées dans notre étude étaient peut être trop courtes ou insuffisamment drastiques pour affecter le métabolisme des graisses.

L'augmentation du pourcentage de masse grasse chez les souris NARC peut être expliquée par des mécanismes d'adaptation à la privation de nourriture et de redistribution des lipides corporels. En effet, il a été montré qu'une RC de 50% de courte durée induisait certes une perte de poids corporel, mais favorisait les dépôts de graisse chez des souris non obèses (Kliewer et al. 2015). De plus, il existerait une redistribution par la RC de la masse grasse viscérale vers le niveau sous-cutané (Varady et al. 2007). Dans certaines études de RC chez le rongeur, la masse grasse totale ne diminuait légèrement voire pas du tout, mais il existait une diminution de la masse grasse viscérale au profit de la graisse sous-cutanée (Barzilai et al. 1998, Anson et al. 2003). La réduction de la graisse corporelle et en particulier de la graisse viscérale est généralement associée aux effets bénéfiques de la RC. Il a été montré que l'ablation chirurgicale de la graisse viscérale chez le rat améliorait la sensibilité à l'insuline (Barzilai et al. 1998, Barzilai et al. 2001). De plus, ces animaux avaient une espérance de vie supérieur à celle des témoins, mais d'une durée inférieure à celle des animaux sous RC (moins 40%) (Muzumdar et al. 2008). Ces résultats suggèrent que la diminution de la graisse viscérale joue un rôle majeur dans l'effet bénéfique de la RC.

En ce qui concerne le métabolisme du glucose, la glycémie à jeun était similaire entre les groupes NA et SAPN alors que le taux d'insuline était significativement augmenté, ce qui conduisait à une augmentation de l'indice HOMA-IR. Les tests de tolérance au glucose et à l'insuline ont confirmé que les souris SAPN présentaient une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline à l'âge adulte. L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie ont été rapportées chez les souris SAPN jeunes au moment du sevrage (Du et al. 2015) avec une augmentation d'expression d'insuline dans le pancréas. L'hyperinsulinémie est également observée chez les rats SAPN à l'âge adulte avec une augmentation de la sécrétion d'insuline et d'expression de GLUT2 dans les îlots pancréatiques (Cunha et al. 2009). Ces résultats indiquent qu'une SAPN, au cours d'une période critique du développement du rongeur, peut programmer des modifications permanentes de la fonction endocrinienne pancréatique sur la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose.

La RC induit un effet bénéfique sur le métabolisme du glucose chez les souris SAPN. Après 4 semaines de RC, le taux d'insuline circulant et l'indice HOMA-IR étaient réduits chez les souris SARC. De plus, les souris SARC étaient capables de mieux réguler leur glycémie après une injection de glucose ou d'insuline. En revanche, la RC n'a pas modifié le métabolisme du glucose chez les souris NARC. Une étude réalisée chez le rat, pour lequel la suralimentation était induite par l'administration d'un lait enrichi en hydrates de carbone pendant les trois premières semaines postnatales a montré qu'une alimentation appropriée et contrôlée à partir du sevrage pouvait réduire le gain de poids corporel et le taux de leptine et d'insuline plasmatique (Srinivasan et al. 2013). Toutefois, si les animaux étaient à nouveau laissés à une alimentation *ad libitum*, ces améliorations disparaissent et les rats reprenaient du poids et présentaient à nouveau une fonction métabolique altérée (Srinivasan et al. 2013). De plus, cette équipe a montré qu'une RC plus sévère et plus longue, moins 24% durant 3 mois, induisait des effets plus durables sur la régulation du poids corporel et sur le taux de leptine et d'insuline plasmatique, par une restauration de la régulation hypothalamique des circuits de l'appétit et de la satiété, qui étaient « perturbés » par la programmation postnatale (Liu et al. 2013).

En conclusion, chez les souris, la SAPN induit une augmentation du poids corporel avec une augmentation de la masse grasse totale, associée à une altération du métabolisme glucidique, matérialisée par une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. Une RC modérée de moins 20% a permis de diminuer le poids corporel dans les deux groupes des souris, sans affecter la masse grasse totale, ce qui peut être expliqué par une redistribution de l'adiposité. Sur le plan métabolique, une amélioration du métabolisme du glucose a été observée chez les souris SARC mais pas chez les souris NA soumises à une RC.

B. Deuxième partie : Effets cardiovasculaires de la restriction calorique chez les souris ayant subi une suralimentation postnatale

1. Introduction

Dans cette introduction, comme dans le chapitre précèdent nous reprendrons les points expérimentaux et cliniques qui orienteront notre discussion ultérieure des résultats de cette partie de ma thèse.

L'augmentation du poids corporel est souvent liée à une prédisposition au développement d'une hypertension artérielle, de pathologies coronariennes (Aurigemma et al. 2013) ou d'hypertrophie cardiaque (Alpert 2001). Elle constitue également un facteur de risque d'insuffisance cardiaque (Kenchaiah et al. 2002). La corrélation positive entre l'obésité et la pression artérielle existe à la fois chez les adultes et chez les enfants (Sorof et al. 2002). Les études cliniques ont mis en évidence la relation entre l'environnement nutritionnel périnatal et le risque cardiovasculaire à l'âge d'adulte (Singhal et al. 2004). Ainsi, l'accélération de la prise de poids pendant la période postnatale est associée à une augmentation des niveaux de la pression artérielle (Lever et al. 1992) et un IMC élevé pendant l'enfance est relié à l'âge adulte à une augmentation du risque de développement de pathologies cardio-vasculaires (Baker et al. 2007).

Chez le rongeur, la SAPN induit une augmentation du poids corporel au sevrage et à l'âge adulte. Certaines études montrent qu'en plus des modifications métaboliques, la SAPN induit une hypertrophie cardiaque précoce (Martins et al. 2008, Moreira et al. 2009), une augmentation du dépôt de collagène (Velkoska et al. 2008, Habbout et al. 2012, Habbout et al. 2013, Vieira et al. 2015, Bernardo et al. 2016), une diminution de la densité microvasculaire au niveau du cœur (Moreira et al. 2009) et parfois une augmentation modérée de la pression artérielle (Plagemann et al. 1999, Boubred et al. 2007, Kappeler et al. 2009, Yim et al. 2012, Habbout et al. 2013, Achard et al. 2015, Mozes et al. 2015, Sefcikova et al. 2015). Cependant, certaines études ne confirment pas cette hypertension (Velkoska et al. 2008, Rajia et al. 2010). Les résultats préalables publiés par équipe montrent que la SAPN induit chez la souris une diminution progressive de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) et une dilatation ventriculaire gauche en diastole et systole (Habbout et al. 2012, Habbout et al. 2013). De plus, il a été montré que les cœurs des animaux SAPN étaient plus sensibles aux lésions d'ischémie-reperfusion réalisées *ex vivo* sur un modèle de cœur isolé perfusé. Ces travaux ont en outre précisé que la SAPN chez les souris conduisait à des changements précoces d'expression d'un nombre important de gènes au niveau cardiaque, qui pourraient participer à des modifications perturbant de manière permanente l'organisation structurelle du cœur et le métabolisme cardiaque, et qui conduiraient à des altérations de la capacité contractile cardiaque et à une majoration de la sensibilité myocardique à l'ischémie (Habbout et al. 2013).

D'une manière générale, la RC conduit à une perte de poids et améliore la dysfonction métabolique liée à l'obésité (Raitakari et al. 2004, Pierce et al. 2008). Les études cliniques montrent que la RC diminue la pression artérielle, améliore la sensibilité à l'insuline et les profils lipidiques plasmatiques chez l'Homme (Sasaki et al. 2002, Fontana et al. 2007). Ces améliorations pourraient contribuer, au moins indirectement, à une reduction de la morbidité cardiovasculaire ((Shinmura et al. 2007). De plus, certaines études précisent que la RC peut avoir des effets bénéfiques sur le vieillissement du système cardiovasculaire et prévenir les risques d'athérosclérose, en diminuant le niveau du stress oxydant cardiaque et vasculaire. Une activation de la biogenèse mitochondriale a été évoquée dans ce cadre (Shinmura et al. 2007, Bales et al. 2013). La RC est également connue pour protéger le cœur contre les lésions d'ischémie-reperfusion (Rohrbach et al. 2014). La question que nous nous sommes posée a été de savoir si le rétablissement d'un poids corporel normal et la restauration de certains aspects métaboliques pourraient améliorer la fonction cardiaque et la sensibilité à l'ischémie-reperfusion du myocarde chez les souris SAPN adultes, à une étape où ces modifications sont déjà installées au niveau cardiaque.

Pour ce faire, nous avons suivi la fonction cardiaque par échocardiographie dans les 4 groupes de souris avant et après les 4 semaines de RC. A 7 mois, les souris ont été euthanasiées et les cœurs prélevés et perfusés selon le technique Langendorff afin d'évaluer la sensibilité myocardique à l'ischémie-reperfusion. A la fin du protocole d'ischémie globale totale de 30 min suivie par une reperfusion de 2 h, le marquage des zones infarcies a été effectué afin de quantifier la taille de l'infarctus cardiaque.

2. Résultats

a) Poids du cœur

A l'âge de 6 mois, le poids du cœur était plus important chez les souris SAPN que chez les souris NA (142 ± 3 mg vs. 119 ± 3 mg, p<0,001, Test Mann-Whitney). Lorsqu'on rapporte le poids du cœur au poids corporel de la souris, le ratio reste plus élevé chez les souris SAPN par rapport aux souris NA (0,33 ± 0,01% vs 0,36 ± 0,02%, p=0,024).

Après 4 semaines de RC, le poids des cœurs des 2 groupes sous RC avait diminué. Les cœurs du groupe NARC avaient perdu 11 mg (104 ± 1 mg vs 115 ± 2 mg, p=0,03) alors que ceux du groupe SARC avaient perdu environ 15 mg (130 ± 4 mg vs 145 ± 4 mg, p<0,001). Lorsqu'on rapporte le poids du cœur au poids corporel de la souris, le ratio n'a pas évolué dans les 2 groupes sous RC, ni chez les souris SAAL, mais a significativement augmenté dans les groupes NAAL (Figure 18).

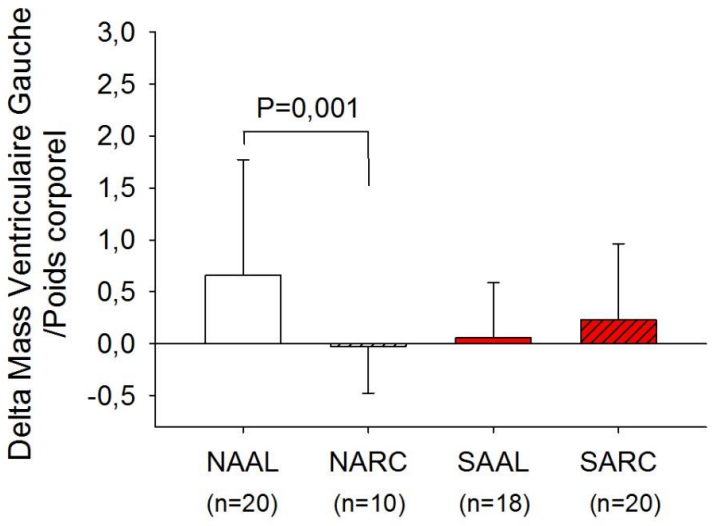

Figure 18 : Variation du rapport entre le poids des cœurs et le poids corporel des souris avant et après 4 semaines de restriction calorique au sein des quatre groupes de souris.

NAAL : normoalimentée ad libitum
NARC : normoalimentée en restriction calorique
SAAL : suralimentée pendant la période postnatale ad libitum
SARC : suralimentée pendant la période postnatale en restriction calorique

b) Fraction d'éjection et fraction de raccourcissement du ventricule gauche

A l'âge de 6 mois, la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) était plus basse chez les souris SAPN que chez les souris NA (51,06% ± 0,93 vs .57,58% ± 0,93, p<0,001). Après 4 semaines de régime, les FEVG restaient stables dans les deux groupes de souris *ad libitum* (NAAL et SAAL). La RC n'a pas eu d'effet sur les FEVG des souris NARC, mais a significativement augmenté la FEVG des souris du groupe SARC (52,2%±0,9 vs, 60,1%±1,3, p<0,001), dont les valeurs rejoignaient alors celles du groupe NAAL.

De manière similaire, les fractions de raccourcissement, initialement plus basses chez les souris SAPN, ont significativement augmenté après 4 semaines de RC dans le groupe SARC. Celles des groupes *ad libitum* (NAAL et SAAL) n'ont pas été modifiées après 4 semaines.

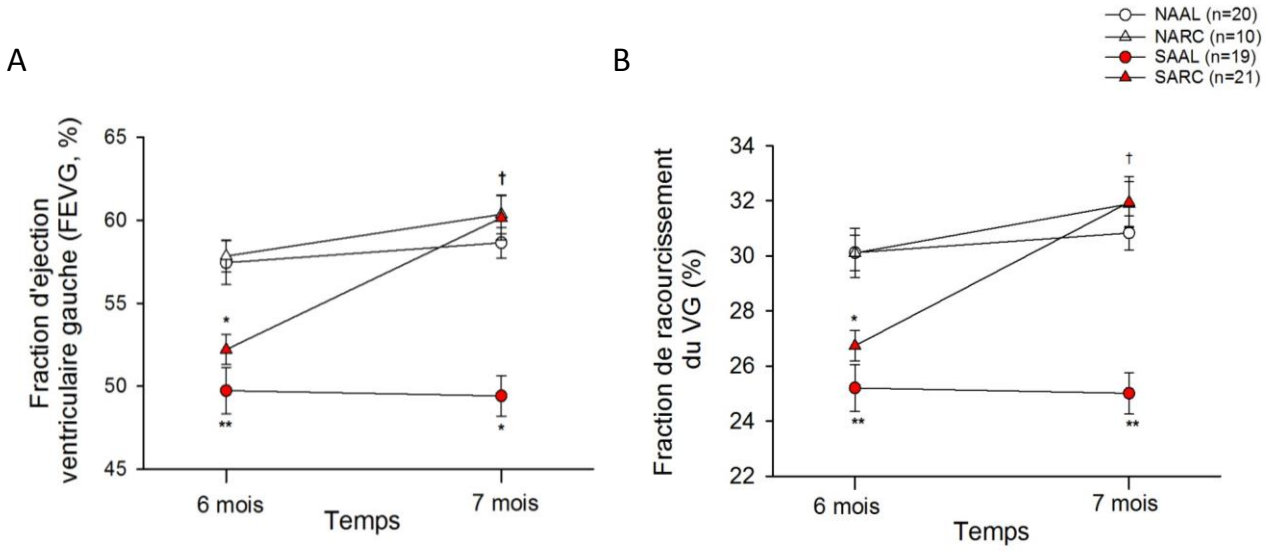

Figure 19 : Evolution des fractions d'éjection (A) et des fractions de raccourcissement (B) du ventricule gauche au sein des quatre groupes de souris avant et après 4 semaines de restriction calorique.

* : significativement différent du groupe NAAL, p<0,01

** : significativement différent du groupe NAAL, p<0,001

† : significativement différent du groupe SAAL, P<0,01

c) Diamètre du ventricule gauche en diastole et en systole

A l'âge de 6 mois, les diamètres télédiastolique et télésystolique du ventricule gauche étaient plus élevés chez les souris SAPN que chez les souris NA. Après 4 semaines de RC, les diamètres télédiastolique et télésystolique, stables dans les deux groupes *ad libitum* (NAAL et SAAL), avaient diminué significativement chez les souris SARC par rapport aux souris SAAL. Le diamètre télésystolique n'avait pas été modifié par la RC dans le groupe NARC, mais le diamètre télédiastolique avait augmenté chez les souris NARC par rapport aux souris NAAL (p=0,035).

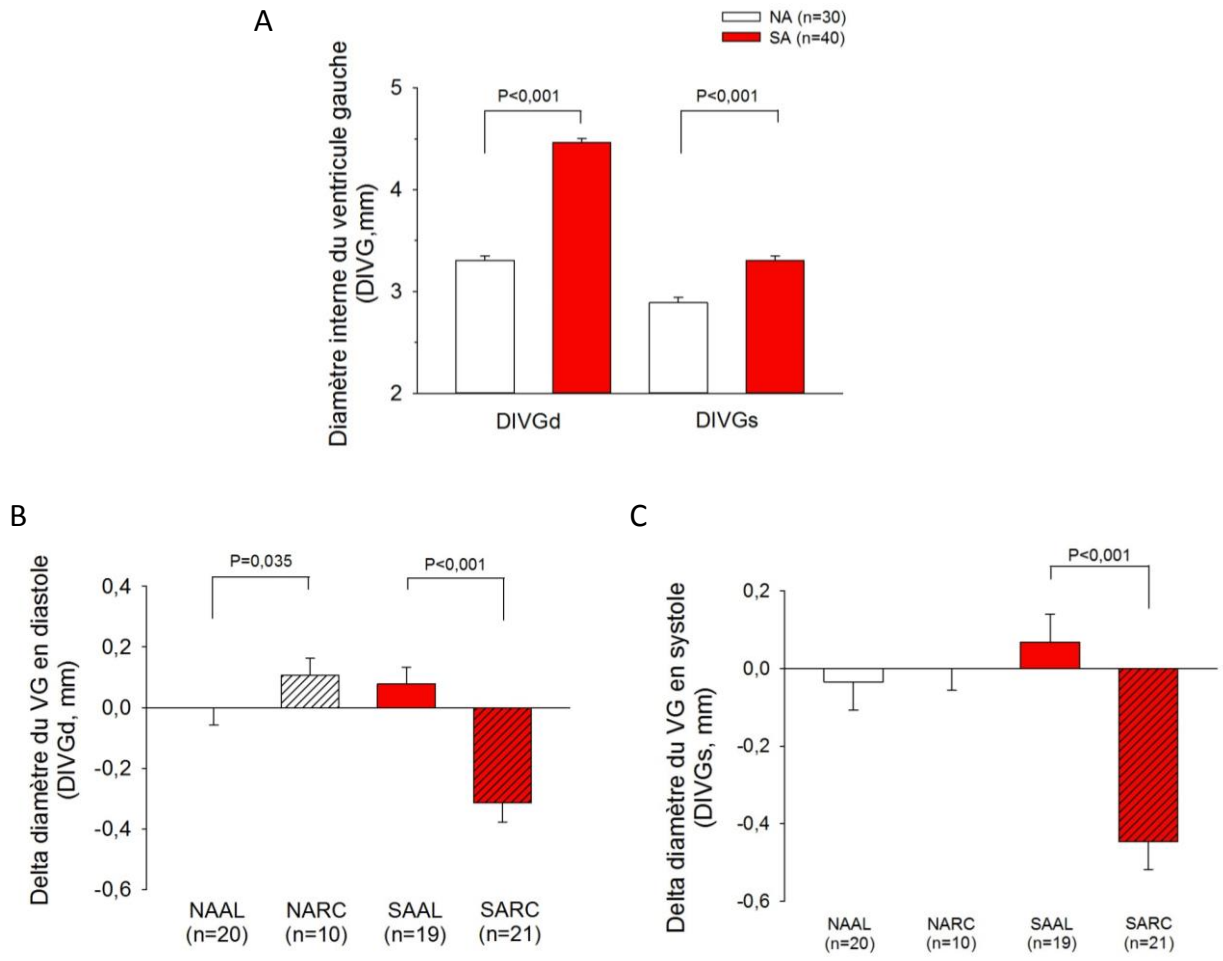

Figure 20 : Diamètres télédiastoliques et télésystoliques au sein des 2 groupes avant RC (A) et évolution des diamètres télédiastoliques (B) et télésystoliques (C) du ventricule gauche au sein des quatre groupes de souris après 4 semaines de restriction calorique.

d) Evaluation des paramètres hémodynamiques cardiaques après 4 semaines de RC sur un modèle ex vivo de cœur isolé perfusé

Après 15 minutes de stabilisation sur le montage de Langendorff, les cœurs isolés étaient perfusés pendant 10 minutes afin de recueillir les paramètres fonctionnels cardiaques de base avant l'ischémie. En période pré-ischémique, les valeurs de la pression développée du ventricule gauche, de débit coronaire et de la fréquence cardiaque étaient comparables entre les quatre groupes (Figure 21).

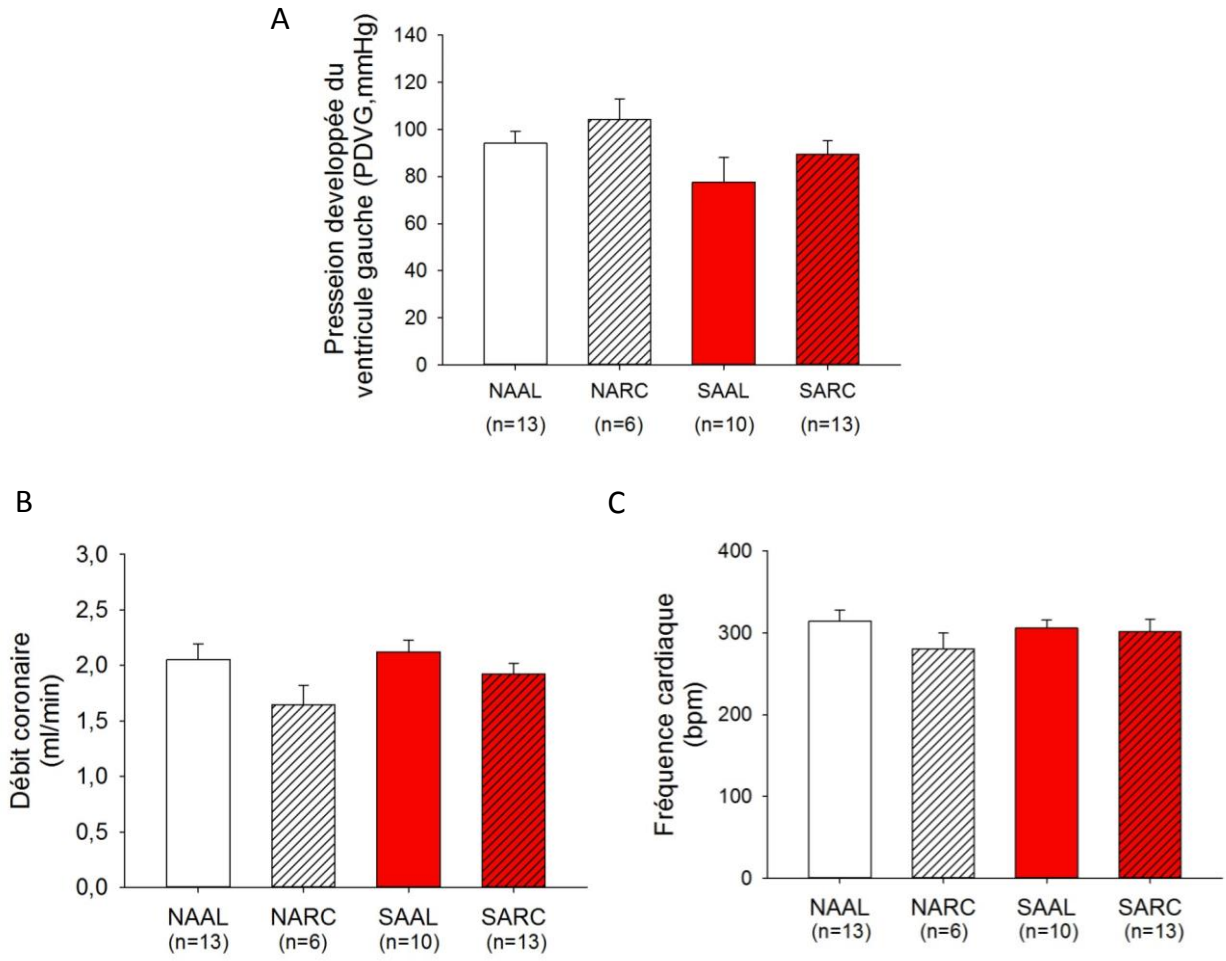

Figure 21 : Représentation de la pression développée par le ventricule gauche (A), du débit coronaire (B) et de la fréquence cardiaque (C) des cœurs isolés perfusés, après 15 minutes de perfusion au sein des quatre groupes de souris.

e) Récupération de la pression développée et du débit coronaire après 30 min d'ischémie

Après une ischémie globale totale de 30 minutes, la pression développée par le ventricule gauche, initialement nulle, augmentait progressivement lors de la période de reperfusion au sein des quatre groupes de souris. La récupération de la pression développée atteignait environ 25% de sa valeur initiale après 1 heure de reperfusion dans les deux groupes de souris *ad libitum* (NAAL et SAAL). La récupération de la pression développée était significativement meilleure après 1 heure de reperfusion dans les deux groupes de souris sous RC que pour leurs groupes respectifs.

Les mêmes améliorations du débit coronaire, en tout début de reperfusion, ont été observées chez les souris NARC et SARC par rapport aux contrôles *ad libitum*.

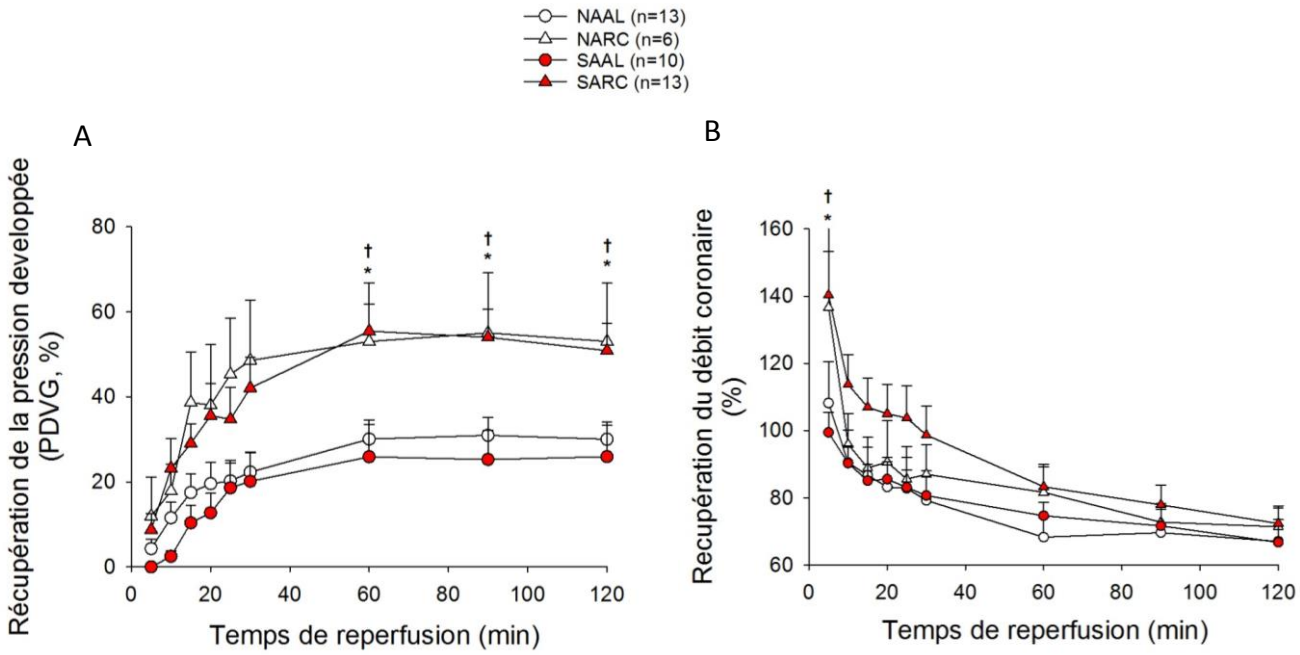

Figure 22 : Récupération de la pression développée par le ventricule gauche (A) et du débit coronaire (B) des cœurs isolés perfusés, après 30 minutes d'ischémie globale totale, pendant la reperfusion.

Les résultats sont exprimés en % des valeurs pré-ischémiques.

* : significativement différent du groupe NAAL, p<0,05

† : significativement différent du groupe SAAL, P<0,05

f) Evolution de la pression diastolique au cours du processus d'ischémie-reperfusion

La pression diastolique ventriculaire gauche, ajustée au début de l'expérimentation entre 4 et 10 mmHg, ne varie pas au cours de la période de perfusion initiale. En revanche, après 5 minutes d'ischémie globale totale, il se produit une augmentation progressive de la pression diastolique dans les quatre groupes, ce qui signe la contracture ischémique. La cinétique de la pression diastolique au cours de l'ischémie était semblable dans les quatre groupes et il n'y avait pas de différence d'intensité de la contracture ischémique entre les quatre groupes.

La reperfusion qui suit l'ischémie s'accompagne d'une seconde augmentation, importante et rapide, de la pression diastolique caractérisant, dans les quatre groupes, le phénomène de contracture post-ischémique. La pression diastolique atteint le pic de contracture post-ischémique 5 minutes après la reperfusion puis diminue lentement tout au long de la reperfusion. La contracture post-ischémique était moins importante tout au long de la période de reperfusion dans le groupe de cœurs des souris SARC.

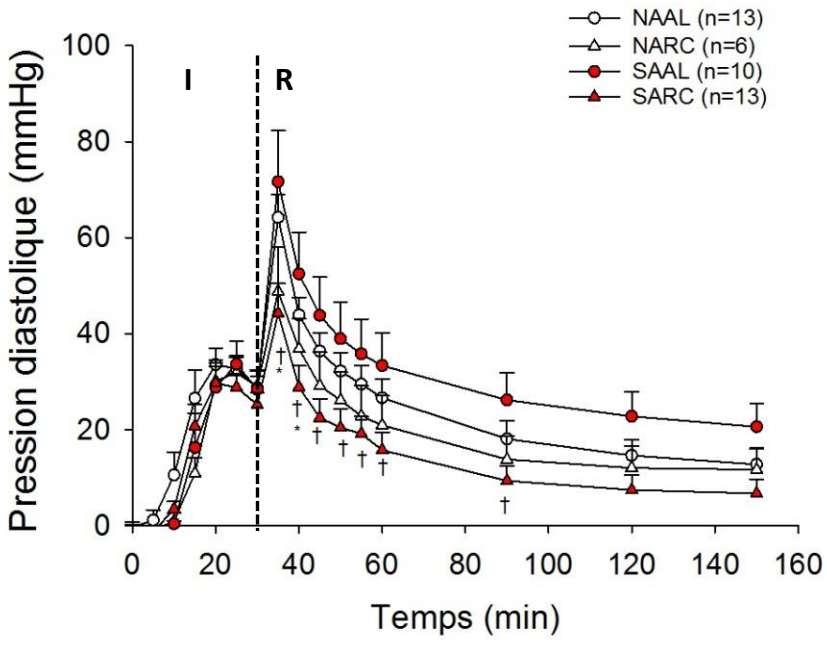

Figure 23 : Evolution de la pression diastolique ventriculaire gauche au cours de la séquence ischémie (I) reperfusion (R) (30 min d'ischémie globale totale suivies de 2 heures de reperfusion)

* : significativement différent du groupe NAAL, p<0,05

† : significativement différent du groupe SAAL, P<0,05

g) Evolution de dP/dt max et dP/dt min au cours du processus d'ischémie-reperfusion

Pendant la période pré-ischémique, aucune différence au niveau des indices de contraction (dP/dt max) et de relaxation myocardique (dP/dt min) n'était observée entre les cœurs des quatre groupes de souris. Après 30 minutes d'ischémie globale, les souris SARC récupéraient mieux au niveau de la dP/dt max et dP/dt min que les autres groupes de souris pendant la période de reperfusion.

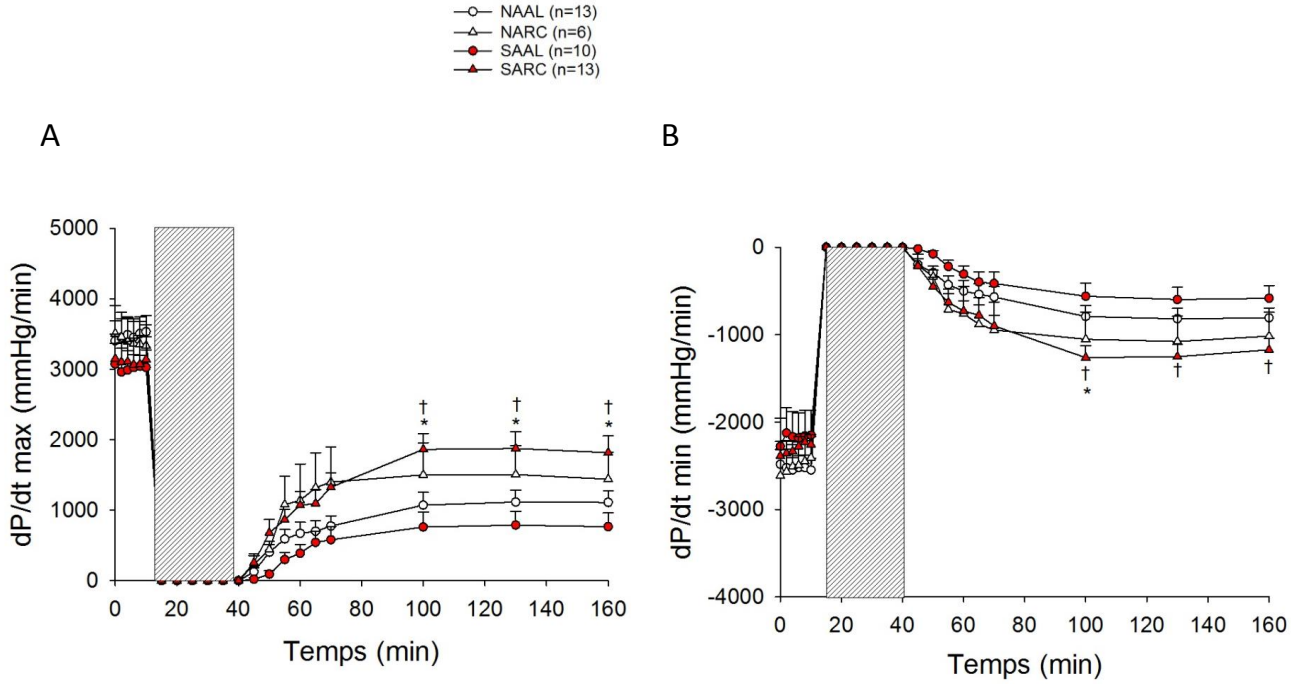

Figure 24 : Evolution de dP/dt max et dP/dt min au cours de la séquence ischémie reperfusion (30 min d'ischémie globale totale suivies de 2 heures de reperfusion)

* : significativement différent du groupe NAAL, p<0,05

† : significativement différent du groupe SAAL, P<0,05

h) Taille de l'infarctus

A la fin du protocole d'ischémie reperfusion, les coupes de cœurs ont mis au contact du TTC afin de déterminer les zones toujours viables (rouges) et nécrotiques (blanches), ce qui permet de quantifier la taille de la zone infarcie. La Figure 25 montre les images typiquement obtenues sur les cœurs des quatre groupes colorés au TTC suite à 30 minutes d'ischémie globale totale suivies de 2 heures de reperfusion. Nos résultats montrent que les cœurs des souris SAAL présentent une taille d'infarctus plus élevée que celle des souris NAAL, ce qui indique que les souris SAAL sont plus sensibles aux lésions d'ischémie/reperfusion. Une diminution de la zone infarcie est observée chez les souris SARC, ce qui est en faveur de l'installation d'une cardioprotection chez ces souris dans les semaines qui suivent la phase de RC.

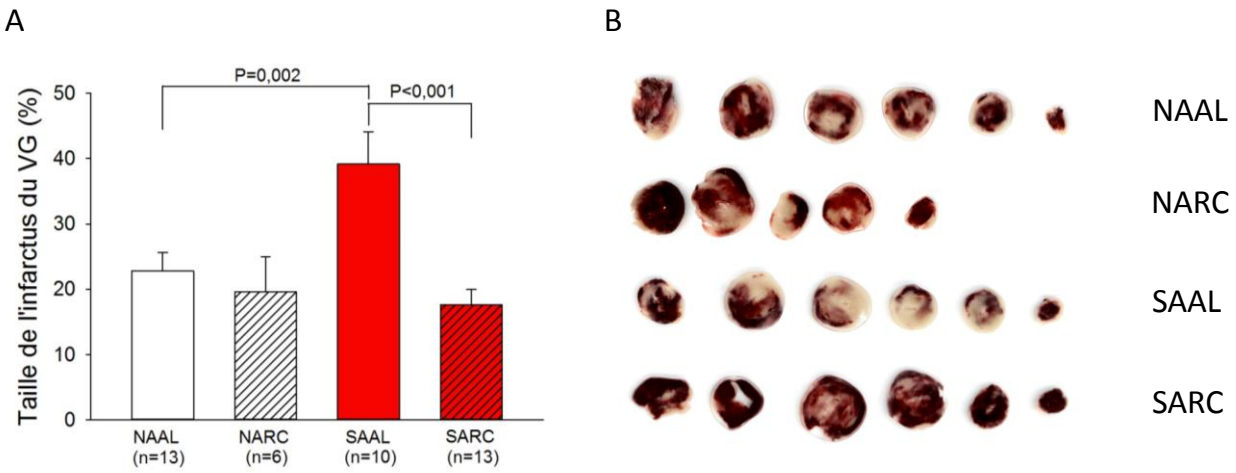

Figure 25 : Quantification par planimétrie de la taille de la zone infarcie (A) et coupes transversales marquées au TTC de cœurs (B) soumis à 30 min d'ischémie globale totale suivies de 2 heures de reperfusion.

3. Discussion

Les cardiomyopathies liées à l'obésité sont associées à une augmentation de la fibrose interstitielle et à une dysfonction diastolique. Elle induit, au fil du temps, des anomalies comprenant une hypertrophie et une dysfonction systolique, entrainant éventuellement une insuffisance cardiaque (Mandavia et al. 2012). Des études cliniques ont mis en évidence l'impact de la nutrition précoce pendant l'enfance sur la santé cardiovasculaire à long terme (Singhal et al. 2004, Singhal et al. 2007).

La SAPN induit un surpoids au sevrage mais aussi tout au long de la maturation, accompagné de détériorations métaboliques telles qu'un accroissement de l'adiposité, une hyperleptinémie et une insulino-résistance. Dans notre étude, nous avons observé une augmentation du poids des cœurs à l'âge de 6 mois chez les souris SAPN. Cette augmentation persiste même lorsque le poids du cœur est rapporté au poids corporel. Chez les rongeurs SAPN au sevrage, l'hypertrophie est associée à une augmentation d'épaisseur des ventricules gauche et droit, de la taille des cardiomyocytes et à une diminution de la densité de la vascularisation coronaire (Moreira et al. 2009, Bernardo et al. 2016). Toutefois, ces résultats ne sont pas consensuels car certaines études réalisées chez les souris Swiss montrent une hypertrophie à l'âge de 4 mois mais pas à 6 mois. La différence peut être reliée à des différences touchant la souche d'animaux, l'âge ou la méthode de mesure.

Dans notre étude, la SAPN est associée à une baisse de la FEVG et à une augmentation des diamètres du ventricule gauche chez les souris SAPN de 6 et 7 mois, ce qui confirme les travaux précédemment publiés par notre équipe. Cette cardiomyopathie dilatée chez les souris SAPN s'accompagne d'une augmentation du dépôt de collagène (Vieira et al. 2015, Bernardo et al. 2016) et d'un accroissement de l'expression et de l'activité de la matrice métalloprotéinase-2 au niveau cardiaque (Habbout et al. 2013). Le ventricule dilaté et la baisse de la FEVG pourraient être des conséquences d'un surpoids chez les souris SAPN. Toutefois, les résultats de microarray précisent que la SAPN est capable d'infléchir précocement 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 au sein du tissu cardiaque (Habbout et al. 2013). Ces modifications précoces pourraient altérer la compliance ventriculaire et expliquer la diminution de la FEVG ainsi que l'élargissement du ventricule. De plus, le remodelage cardiaque peut être favorisé par des hormones, cytokines ou certains facteurs de croissance. Au niveau cardiaque, la leptine ou l'insuline peuvent être considérées comme des facteurs biochimiques participant à des régulations de l'adaptation des cardiomyocytes à des contraintes mécaniques et /ou à de nouveaux environnements métaboliques. L'hyperinsulinémie et l'hyperleptinemie sont présentes chez les rongeurs

SAPN à tous les stades du développement. Une étude chez les souris Swiss précisé, par ailleurs, que la voie de la signalisation de l'insuline est altérée par la SAPN à l'âge de 5 mois (Moreira et al. 2009).

Dans la première partie de notre étude, nous avons observé que la RC améliorait les altérations métaboliques induites par la SAPN. De plus, il a été montré que la RC exerçait des effets directs sur le vieillissement du cœur en diminuant les dommages oxydatifs cardiaques (Corbi et al. 2012). Plusieurs études expérimentales ont montré que la perte de poids obtenue par RC atténuait l'hypertrophie du VG, la fibrose ventriculaire et la dysfonction diastolique (Taffet et al. 1997, Kemi et al. 2000, Seymour et al. 2006). Nous avons donc évalué si la RC pouvait inverser la dysfonction cardiaque induite par la SAPN. Nos résultats ont révélé un effet bénéfique de la RC chez les souris SARC, avec une augmentation de la FEVG et une diminution du diamètre du ventricule gauche. En revanche, la RC n'a pas eu d'effet significatif sur la fonction cardiaque des souris NARC. Des études chez l'Homme ont montré que la RC pouvait améliorer la fonction diastolique du ventricule gauche (Meyer et al. 2006). Il est important de rappeler que les principaux facteurs de risque des maladies coronariennes sont améliorés par la RC chez l'Homme non obèse (Fontana et al. 2007). Expérimentalement, chez les rats obèses, la RC corrige non seulement l'obésité mais atténue aussi l'hypertension artérielle, l'hypertrophie du ventricule gauche, la dysfonction diastolique et l'analyse de la fibrose associée à ces altérations fonctionnelles (Takatsu et al. 2013).

La SAPN altère non seulement la fonction contractile cardiaque mais elle induit aussi une dilatation ventriculaire gauche et rend aussi les cœurs plus sensibles aux lésions d'ischémie-reperfusion. La RC à court ou long terme améliore la tolérance ischémique chez les animaux jeunes ou âgés (Shinmura (Shinmura et al. 2005, Shinmura et al. 2008, Edwards et al. 2010). Nous avons donc examiné la récupération du débit coronaire et de la pression développée ventriculaire gauche après une ischémie 30 min induite *in vitro* dans un modèle de cœur isolé et perfusé selon la méthode de Langendorff. Ce modèle nous a permis d'évaluer la fonction cardiaque en dehors de toute influence de régulation neuro-humorale. Nos résultats antérieurs avaient montré que les cœurs des souris adultes SAPN étaient plus sensibles aux lésions d'ischémie-reperfusion et présentaient une taille d'infarctus plus grande (Habbout (Habbout et al. 2013), ce qui a été, en partie, retrouvé dans ce travail. Une étude récente chez les souris *Swiss* rapporte que les souris adultes SAPN présentaient des modifications d'expression de protéines impliquées dans le métabolisme cardiaque et une détérioration hémodynamique lors d'une séquence d'ischémie-reperfusion (Vieira et al. 2015). Cette altération de la récupération des paramètres cardiaques pourrait résulter d'une réorganisation structurelle myocardique (Velkoska et al. 2008, Moreira et al. 2009). La SAPN induit des modifications de l'architecture cardiaque, avec un dépôt plus

important de fibres de collagènes, marquant un état de remodelage fibreux du ventricule. L'augmentation d'expression et d'activité de la MMP-2 peut également être impliquée dans les phénomènes de remodelage cardiaque suite à une ischémie-reperfusion (Kandasamy et al. 2010).

La RC protège les cœurs contre les lésions ischémiques chez les souris SARC et les souris NARC avec une meilleure récupération de la pression développée, de la dP/dt max et de la dP/dt min pendant la reperfusion post-ischémique. Cependant, une diminution de la contracture post-ischémique et de la taille de la zone de l'infarctus est observée uniquement chez les souris SARC, ce qui signifie que l'amélioration par la RC est plus efficace chez les souris SARC.

Globalement, ces résultats soulignent un effet bénéfique de la RC de 20% à court terme chez les souris SAPN avec une restauration totale de la fonction cardiaque *in vivo* et une diminution de la sensibilité cardiaque aux lésions d'ischémie-reperfusion induites *ex vivo*. Une étude récente rapporte qu'une RC de 30% pendant 7 jours était associée à une cardioprotection avec une diminution de la taille de l'infarctus chez les souris de 4 mois. Les analyses d'expression d'ARNm et de microARN au niveau des tissus cardiaques montrent qu'une RC de 7 jours module l'expression des gènes impliqués dans l'horloge circadienne, le stress oxydatif, la fonction immunitaire, l'apoptose, le métabolisme, l'angiogenèse, le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Noyan et al. 2015). Les mécanismes exacts de l'effet bénéfique de notre protocole RC sur les souris ayant subi une SAPN feront l'objet de travaux ultérieur au sein de notre groupe.

C. Troisième partie : Conséquences mitochondriales et oxydatives cardiaques d'une suralimentation postnatale et d'une restriction calorique

1. Introduction

Comme nous l'avons décrit dans la partie synthèse bibliographie, le cœur est un organe présentant un niveau métabolique extrêmement actif. De par ses fonctions mécaniques permanentes, il a besoin de maintenir précisément son homéostasie énergétique, de réguler et d'optimiser la dynamique et la fonction mitochondriale. La mitochondrie est en effet la principale source d'ATP de la cellule mais elle joue un rôle essentiel non seulement dans la régulation de l'homéostasie énergique cellulaire mais aussi dans la mise en œuvre des processus apoptotiques. En raison de sa forte demande énergique qui requiert une très forte densité mitochondriale cellulaire, le cœur est un organe particulièrement vulnérable à une dysfonction mitochondriale, qu'elle soit liée à une altération structurale, à une fluctuation du rendement énergique ou à une altération de la signalisation mitochondriale (Tocchi et al. 2015). Des études cliniques et expérimentales ont montré qu'un défaut bioénergique mitochondrial pouvait être impliqué, du moins en partie, dans la diminution de la capacité contractile myocardique, dans l'augmentation de la sensibilité à l'ischémie-reperfusion, dans l'apparition et la constitution de la fibrose et de l'apoptose myocardique (Marín-García et al. 2008).

L'augmentation de la production mitochondriale d'EROs joue un rôle important dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires métaboliques (Boudina et al. 2005, Rosca et al. 2013). Certaines études ont suggéré que la détérioration énergétique mitochondriale associée à l'obésité et au diabète de type 2 pouvait contribuer à l'installation d'une dysfonction cardiaque (Boudina et al. 2005, Boudina et al. 2007). Il a été montré chez l'animal qu'une obésité induite par un régime riche en lipides entrainait une cardiomyopathie dilatée. Cette altération fonctionnelle était associée à une dysfonction mitochondriale, à une augmentation de la production du H_2O_2 et à une diminution du ratio GSH/GSSH. Ces modifications métaboliques s'accompagnent d'une réduction de la synthèse d'ATP et d'une altération de la respiration associée au Complexe I et de l'activité du Complexe II au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale (Kang et al. 2015, Sverdlov et al. 2015, Sverdlov et al. 2016).

Dans le cardiomyocyte, la mitochondrie représente une source majeure de production de radicaux libres mais en même temps, elle est aussi particulièrement susceptible aux lésions oxydatives. Les espèces réactives oxygénées produites par la mitochondrie sont en effet susceptibles de détériorer l'ADN mitochondrial, ainsi que les lipides et des protéines qui la constituent (Barja et al. 2000). En ce qui concerne la RC, ces conditions nutritionnelles exercent des effets pléiotropies sur le plan cardio-métabolique. Plusieurs travaux suggèrent que ces effets bénéfiques de la RC passeraient par une diminution du niveau du stress oxydant mitochondrial. Certaines études expérimentales précisent que la RC diminue 1) la production d'EROs mitochondriales au niveau myocardiaque (Gredilla et al. 2001, Judge

et al. 2004, Colom et al. 2007, Shinmura et al. 2011) 2) améliore dans des conditions expérimentales chez la souris la biogenèse mitochondriale au niveau du cœur et des muscles squelettiques (Nisoli et al. 2005).

Dans cette troisième partie de notre travail de Thèse, nous nous sommes proposés d'explorer les modifications induites par la SAPN et la RC sur la respiration mitochondriale et le niveau du stress oxydant au niveau de myocarde. La consommation d'oxygène de la chaine respiratoire mitochondriale a été mesurée en utilisant la technique de respirometrie sur tissu myocardique isolé (muscle papillaire) dans les 4 groupes de souris, à 7 mois. La production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERON) a été appréciée par RPE, et les niveaux d'expression des enzymes antioxydantes ont également été évalués au niveau du tissu cardiaque.

2. Résultats

a) Respiration mitochondriale des muscles papillaires isolés

Concernant la consommation basale d'oxygène par le tissu cardiaque (figure 26), il n'y avait aucune différence entre les groupes NAAL et SAAL. Néanmoins, les muscles papillaires des souris ayant subi une RC, NARC et SARC, présentaient une consommation basale d'oxygène plus basse que celle de leurs groupes contrôles *ad libitum*.

Nous avons ensuite introduit le glutamate, le malate et le pyruvate afin de stimuler le complexe I de la chaine respiratoire (NADH déshydrogénase), puis le succinate qui nous a permis d'évaluer la respiration liée au complexe II (succinate déshydrogénase) ; l'introduction de ces substrat se traduisant par une augmentation très importante de la consommation d'oxygène par le muscle cardiaque. Alors qu'il n'y avait pas de différence entre les souris NAAL et SAAL (figure 26 B), les souris SARC présentaient une augmentation de la consommation d'oxygène par rapport aux souris des autres groupes après introduction des substrats, ce qui traduit une activité plus importante des complexes I et II chez les souris SARC.

L'état 3 a été mesuré par l'ajout d'ADP en concentration saturante ce qui permet d'évaluer le niveau de respiration maximal (qui correspond à la phosphorylation oxydative et à l'activité du complexe V). A ce niveau, une augmentation de la consommation d'oxygène a été observée chez toutes les souris ayant subi une RC, NARC et SARC, par rapport à leurs contrôles *ad libitum*, révélant une augmentation de l'activité du complexe V par la RC. Enfin, le carboxy-atractyloside, un inhibiteur de l'échange ATP-ADP, a été ajouté afin d'obtenir l'état 4, c'est-à-dire la respiration indépendante de l'ADP, au cours de laquelle la respiration est seulement stimulée par les substrats. La respiration d'état 4 était significativement améliorée par la RC chez les souris SARC. Toutefois, le RCR (respiration control ratio = état3/état4), un indice de l'efficacité de la phosphorylation oxydative, était comparable entre les 4 groupes.

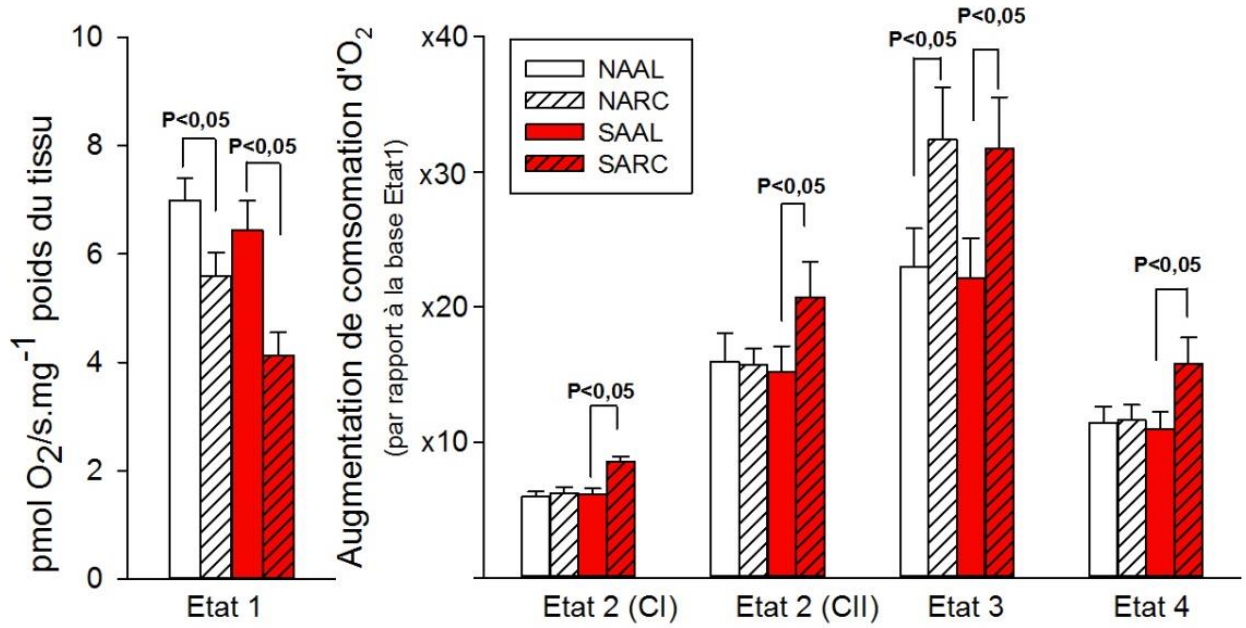

Figure 26 : Respiration basale des muscles papillaires perméabilisés sans stimulation (Etat 1), après l'ajout de glutamate, malate, pyruvate (Etat 2 CI); de succinate (Etat 2 CII) ; d'ADP (Etat 3) ; et de carboxy-atractyloside (Etat 4) au sein des quatre groupes de souris.

NAAL : normoalimentée ad libitum
NARC : normoalimentée en restriction calorique
SAAL : suralimentée pendant la période postnatale ad libitum
SARC : suralimentée pendant la période postnatale en restriction calorique

b) Expression protéique des 5 complexes de la chaine respiratoire mitochondriale

L'expression protéique des cinq complexes de la chaîne respiratoire a été examinée au niveau des tissus cardiaques. Les complexes nucléaires (la sous-unité de 30 kDa du complexe II, la protéine du noyau 2 de la sous-unité du complexe III et la sous-unité α du complexe V) et mitochondriaux (la sous-unité ND6 du complexe I et la sous-unité 1 de complexe IV) ont été quantifiés par Western blot (figure 27B).

L'expression des protéines des complexes IV et V était augmentée par la SAPN dans les cœurs des souris SAAL par rapport aux cœurs des souris NAAL (figure 27A). La RC a entrainé une augmentation de l'expression des protéines du complexe I dans les cœurs des souris SARC, et celle du complexe V chez les souris NARC.

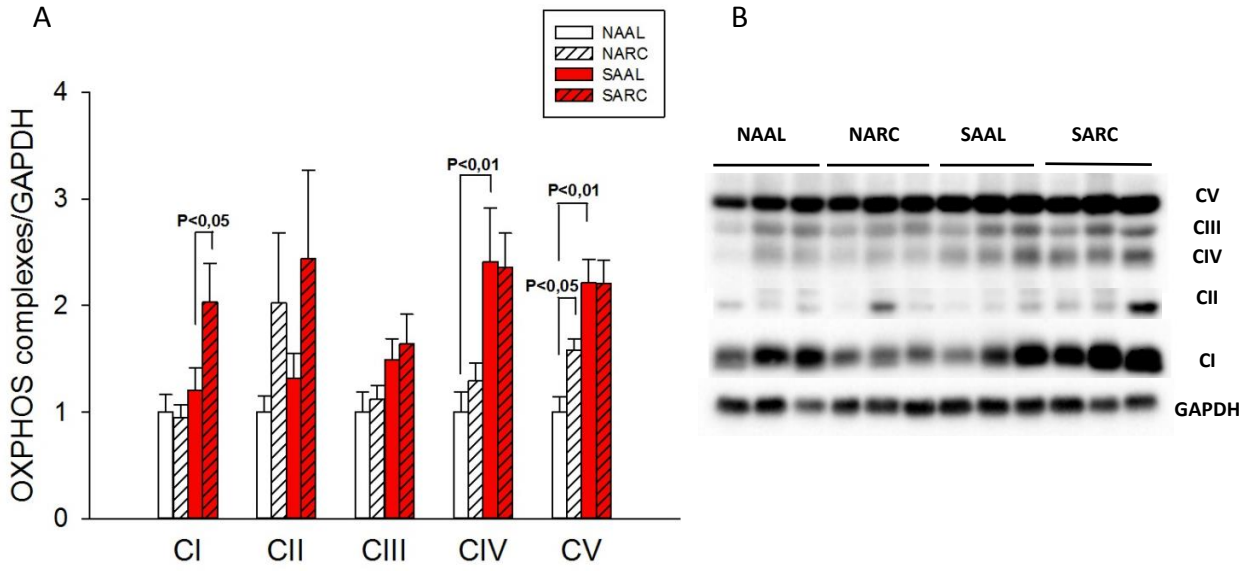

Figure 27 Expression protéique des cinq complexes (CI-CV) de la chaîne respiratoire (OXPHOS) au niveau du tissu cardiaque (A). Illustration de Western blot des niveaux de complexes OXPHOS IV des protéines (B).

Le niveau de protéine cardiaque a été normalisé à la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et à la teneur exprimée par rapport au groupe témoin (NAAL)

c) Etude du stress nitro-oxydatif cardiaque avant et après la RC chez les souris NA et SAPN

Le niveau de production cardiaque d'ERONS a été mesuré par spectroscopie de RPE sur des biopsies fraichement prélevées de tissus cardiaques, incubées en présence de la sonde diamagnétique CMH (Figure 28). A 100K, un signal anisotrope, correspondant à l'oxydation du CMH en radical CP• par les ERONs, a été observé. Après quantification des signaux, il existait un niveau d'oxydation plus élevé de la sonde CMH dans les myocardes de souris SAAL que dans ceux des souris NAAL.

Curieusement, la RC a exercé un effet opposé chez les souris NA et SAPN, avec une diminution de l'oxydation du CMH chez les souris SARC et une augmentation chez les souris NARC. Cependant, l'expression génique des enzymes antioxydantes au niveau du tissu cardiaque était identique chez toutes les souris (Tableau 4).

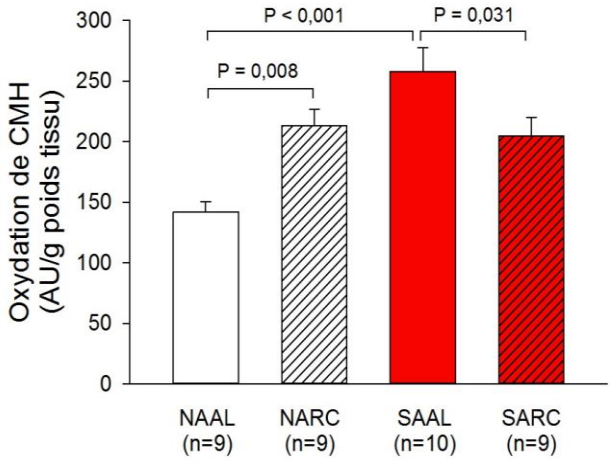

Figure 28 : Evaluation par spectroscopie de RPE du stress nitro-oxydatif tissulaire cardiaque par la production du radical CP• au sein des quatre groupes de souris.

Tableau 4 : Expression génétique des enzymes antioxydantes : Catalase, MnSOD, Cu/ZnSOD.

Gène	NAAL	NARC	SAAL	SARC
MnSOD	0,99 ± 0,09 [a]	0,91 ± 0,04 [a]	1,09 ± 0,04 [a]	0,98 ± 0,03 [a]
Cu/ZnSOD	1,14 ± 0,09 [a]	1,15 ± 0,14 [a]	1,11 ± 0,10 [a]	1,12 ± 0,11 [a]
Catalase	0,80 ± 0,08 [a]	0,96 ± 0,16 [a]	0,99 ± 0,11 [a]	0,99 ± 0,13 [a]

3. Discussion

Le cœur est un organe qui se caractérise par un intense métabolisme aérobie grâce à un nombre important de mitochondries par cardiomyocyte, qui fournissent de grandes quantités d'ATP nécessaires à maintenir une activité contractile continue. Il a été montré qu'une dysfonction mitochondriale se retrouvait dans plusieurs situations physiopathologiques associées au développement progressif d'une cardiomyopathie et liées à l'obésité, l'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie. L'obésité induite par un régime dit « cafétéria » chez la souris entraine des altérations du métabolisme énergique cardiaque, avec une diminution de l'oxydation des hydrates de carbone et des acides gras en amont de la chaine respiratoire mitochondriale mais aussi une diminution de la capacité de couplage entre la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP chez ces souris obèses (Neves et al. 2014). Dans un modèle assez proche de celui que nous avons utilisé, certains auteurs ont rapporté des détériorations de la morphologie mitochondriale chez de jeunes souris soumises à un régime enrichi en graisses pendant l'allaitement. Ces résultats apportent des pistes intéressantes sur les origines de la dysfonction mitochondriale observée chez les animaux ayant subi une programmation postnatale (Turdi et al. 2013).

Dans notre approche expérimentale, nous avons évalué la fonction mitochondriale dans les 4 groupes de souris adultes par respirometrie de haute résolution. Nos résultats ne montrent aucun changement de la respiration mitochondriale dans les muscles papillaires de souris ayant subi une SAPN, SAAL, par rapport aux souris témoins, NAAL. Nous avons toutefois observé une augmentation de l'expression de protéines des complexes IV et V chez les souris SAAL. On peut donc faire l'hypothèse que l'efficacité des complexes IV et V soit diminuée chez les souris SAAL. Une augmentation de l'oxydation des hydrates de carbone a été observée au sevrage chez de jeunes souris Swiss ayant subi une SAPN, avec une augmentation d'activité de la respiration maximale avec les complexes I et II mais sans changements du niveau d'expression protéique des cinq complexes de la chaine respiratoire (Bernardo et al. 2016). Ces résultats suggèrent que la SAPN modifie la précocement la fonction mitochondriale cardiaque, mais qu'un phénomène de compensation se met en place progressivement au cours de la maturité, par l'intermédiaire d'une augmentation d'expression protéique des complexes afin de maintenir une fonction respiratoire mitochondriale normale.

La RC semble induire un effet bénéfique chez les souris SARC, en augmentant la respiration mitochondriale dans les états 2 (CI et CII), 3 (CV) et 4 (respiration découplée), alors que dans le groupe NARC, seul l'état 3 est augmenté. En parallèle, une augmentation de l'expression de protéines du complexe I est observée chez les souris SARC, ce qui est en corrélation avec l'augmentation de la respiration en Etat 2 chez ces souris. Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence qu'au cours de

la RC chez les souris SARC, le tissu cardiaque se met en capacité d'augmenter l'utilisation de substrats énergétiques afin de préserver son efficacité énergétique.

La mitochondrie constitue une source importante d'ERO en tant que sous-produits du fonctionnement normal de la chaîne respiratoire. Dans les cardiomyocytes, qui ont une forte demande énergétique et un nombre conséquent de mitochondries, il existe un état chronique de stress oxydant (Tsutsui et al. 2009). La mitochondrie, qui joue un rôle essentiel dans les processus d'apoptose, d'homéostasie calcique, de production d'ATP et de stress oxydant, est au carrefour des mécanismes impliqués dans la cardioprotection induite par la RC. Nos résultats montrent une augmentation de la production d'ERONs qui n'est pas compensée par une augmentation de l'expression d'enzymes antioxydantes chez les souris SAAL à 7 mois, ce qui souligne une élévation du niveau de stress oxydant dans les tissus cardiaques chez ces souris.

Comme nous l'avons développé précédemment, le stress oxydant, joue un rôle dans l'initiation et le développement de pathologies vasculaires, qui accompagnent l'hypertension artérielle et l'athérosclérose (Dobrian et al. 2001, Furukawa et al. 2004). Des études précédentes réalisées dans notre laboratoire avaient montré que la SAPN induisait une augmentation des taux circulants d'hydroperoxydes, produits de la peroxydation sur les constituants protéiques ou lipidiques du plasma, et une augmentation de la production cardiaque d'ERONs (Habbout et al. 2013). Notre travail confirme cet accroissement du niveau du stress nitro-oxydant tissulaire cardiaque chez les souris SAPN, mais précise qu'après un mois de RC, le stress nitro-oxydant est atténué au niveau du tissu cardiaque chez les souris SARC.

En raison d'une quantité limitée de tissu cardiaque pour réaliser l'ensemble de nos expérimentations de Thèse, nous n'avons pas spécifiquement apprécié le stress oxydant au niveau mitochondrial mais il nous est toutefois possible d'extrapoler nos résultats pour tenter de répondre à cette question. Nous avons observé une augmentation de la respiration mitochondriale dans tous les états stimulés par des substrats, malgré l'absence de l'augmentation d'expression des complexes spécifiques de chaîne mitochondriales (sauf pour le complexe I). Ces résultats pourraient être liés à une efficacité plus importante des complexes mitochondriaux, avec un meilleur transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire et donc une diminution de la production des EROs d'origine mitochondriale dans les cardiomyocytes. Ceci pourrait expliquer l'amélioration de la fonction cardiaque et la protection contre les lésions ischémiques chez les souris SARC. De futurs travaux devront donc être conduits afin de valider cette hypothèse et nous permettre de mieux d'appréhender les changements induits par la SAPN et la RC au niveau mitochondrial.

D. Quatrième partie : Etude des conséquences d'une suralimentation postnatale et d'une restriction calorique sur les voies signalisation de l'insuline et de la leptine au niveau du tissu cardiaque

1. Introduction

Nous avons déjà développé dans l'introduction les liens étroits entre la résistance à l'insuline (RI), l'obésité et le développement d'un diabète de type 2. En outre, de nombreuses études cliniques ont démontré que la RI est un facteur indépendant de prédiction du développement de l'insuffisance cardiaque (Horwich et al. 2010), ce qui suggère que la RI seule peut exercer un effet délétère sur la fonction cardiaque (Wong et al. 2007) (Witteles et al. 2008). Les cardiomyopathies associées avec une RI et/ou une hyperinsulinémie sont caractérisées par une multitude d'altérations telles qu'une atteinte de la signalisation myocardique à l'insuline, une dysfonction mitochondriale, des détériorations de l'homéostasie calcique, une atteinte de la circulation coronaire, une activation du système nerveux sympathique et du système rénine-angiotensine-aldostérone ainsi qu'une mauvaise réponse immunitaire (Jia et al. 2016). En effet, lors d'une surcharge de pression (Hu et al. 2003), d'un traitement par l'isoprénaline (McQueen et al. 2005) ou après un infarctus myocardique (Sena et al. 2009), les souris transgéniques présentant une délétion du récepteur à l'insuline spécifiquement localisée dans les cardiomyocytes (cardiomyocyte-specific delation of Insulin receptor :CIRKO) ou du substrat de ce récepteur (CIRSKO) présentent des détériorations fonctionnelles myocardiques dont l'origine est une dysfonction mitochondriale cardiaque (Boudina et al. 2009), ce qui suggère que la RI aggrave la probabilité de développer une dysfonction contractile, une hypertrophie et la susceptibilité à l'ischémie.

La SAPN induit une hyperinsulinémie et une RI chez les rongeurs au moment du sevrage et également à l'âge adulte. Elle s'accompagne de modifications de la signalisation à l'insuline dans plusieurs tissus, tels que le tissu adipeux blanc (Rodrigues et al. 2007, Bei et al. 2015), l'hypothalamus (Portella et al. 2015), le foie (Conceicao et al. 2013) et les muscles squelettiques (Liu et al. 2013). Chez les rongeurs ayant subi une SAPN, une hyperleptinémie associée à une résistance à la leptine au niveau de l'hypothalamus a été rapportée dans plusieurs études. Elle se caractérise par une diminution de l'expression du récepteur à la leptine (OB-Rb) (Lopez et al. 2005) et de la phosphorylation d'un de ses effecteurs, STAT3 (Glavas et al. 2010, Rodrigues et al. 2011). STAT3 est une des protéines de la famille STAT (Signal Transducers and Activatorsof Transcription) qui joue un rôle important dans la physiopathologie cardiaque (Haghikia et al. 2014). La voie JAK/STAT3 est impliquée dans la signalisation de la leptine et dans certaines voies de cardioprotection. En effet, l'activation d'une des voies cardioprotectrices impliquées dans le préconditionnement ischémique, la voie 'survivor activating factor enhancement' (SAFE), nécessite l'activation de STAT3 (Lecour 2009). Etant donné les rôles essentiels de l'insuline et de la leptine sur la fonction cardiaque, nous avons souhaité évaluer l'expression de certaines

protéines clés de ces voies de signalisation, afin de comprendre les conséquences de la SAPN et de la RC sur la signalisation cardiaque à l'insuline et la leptine.

Compte-tenu des perturbations au niveau du métabolisme énergétique provoquées par la SAPN, il était intéressant d'étudier la régulation d'un facteur primordial impliqué dans l'homéostasie énergétique : l'AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase). L'AMPK est exprimé dans un grand nombre de tissu, comprenant le foie, le cerveau, le muscle squelettique et également les cardiomyocytes (Beauloye et al. 2011, Horman et al. 2012). En tant que senseur métabolique, l'AMPK permet d'ajuster précisément les besoins et la disponibilité énergétique cellulaire. De plus, l'AMPK participe également à la régulation de la prise alimentaire et de la sensibilité des tissus en réponse à de nombreux signaux métaboliques et hormonaux (Foretz et al. 2006) et joue un rôle important dans les effets bénéfiques de la RC (Hardie 2011). En raison de l'ensemble de ces effets majeurs, nous avons souhaité évaluer l'expression protéique de l'AMPK dans les 4 groupes de souris.

2. Résultats

a) Voie de signalisation de l'insuline

Le niveau d'expression protéique du récepteur à l'insuline, au niveau du tissu cardiaque, a été mesuré par Western blot. Nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas de différence d'expression au sein des quatre groupes de souris (Figure 29). L'expression génique du substrat du récepteur à l'insuline (IRS1) et du transporteur de glucose 4 (Glut4) dans le tissu cardiaque n'était également pas différente entre les quatre groupes, suggérant que la voie de signalisation à l'insuline au niveau du cœur n'est que peu ou pas modifiée ni par la SAPN ni par la RC (Tableau 5).

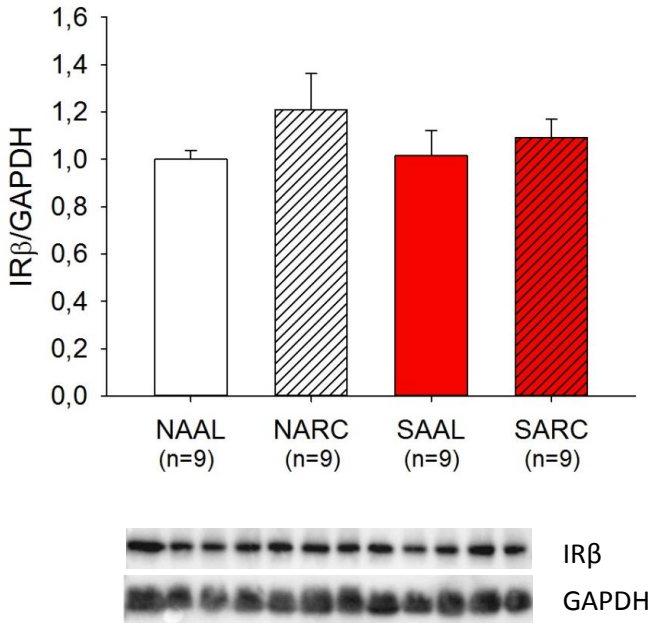

Figure 29 : Expression protéique des récepteurs à l'insuline dans le tissu cardiaque au sein des quatre groupes de souris.

Tableau 5 : Expressions génétiques d'IRS1 et de Glut4 dans les cœurs de souris NA et SA sous restriction calorique (RC). L'effet significatif a été calculé avec un test ANOVA.

Gène	NAAL	NARC	SAAL	SARC
IRS1	0,07 ± 0,01 [a]	0,07 ± 0,01 [a]	0,08 ± 0,01 [a]	0,08 ± 0,01 [a]
Glut4	3,64 ± 0,40 [a]	3,57 ± 0,38 [a]	3,66 ± 0,38 [a]	3,53 ± 0,44 [a]

b) Quantification des protéines pSTAT3/STAT3 et pAMPK/AMPK

Les protéines STAT3 et AMPK, ainsi que leurs formes phosphorylées ont été mesurées sur les tissus myocardiques par Western blot au sein des quatre groupes de souris à l'âge de 7 mois.

Il n'y avait pas de différence sur le rapport de pSTAT3/STAT3 entre les cœurs des souris NAAL et SAAL. En revanche, une augmentation de la phosphorylation de STAT3 a été observée à la fois chez les souris NARC et SARC.

En revanche, en ce qui concerne l'activation de la voie AMPK, le rapport pAMPK/AMPK était identique au sein des 4 groupes de souris.

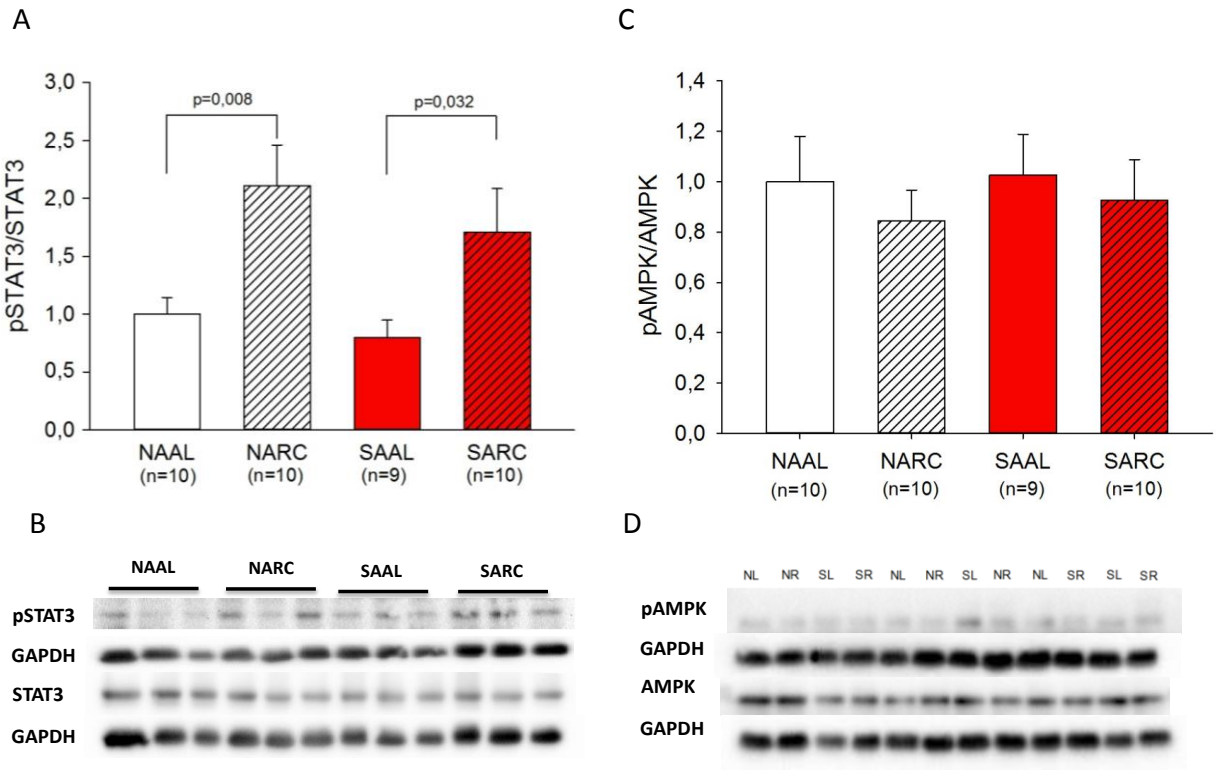

Figure 30 : Expression cardiaque de pSTAT3/STAT3 (A et B) et de pAMPK/AMPK (C et D) déterminée par Western blot. La forme phosphorylée rapportée sur la forme totale de la protéine est indicative de l'activation des protéines respectives.

3. Discussion

La résistance à l'insuline, observée chez les patients obèses, est considérée comme une des premières étapes du développement des maladies cardiovasculaires (Bogardus et al. 1985, Godfrey et al. 2000) et de l'insuffisance cardiaque (Morisco et al. 2006).

Au cours du développement embryonnaire, le transport du glucose au niveau des cellules cardiaque s'effectue d'une manière indépendante de l'insuline par le transporteur de glucose GLUT1 ; par la suite, après la naissance, ce transport est progressivement remplacé par un transporteur insulino-dépendant, GLUT4 (Santalucia et al. 1992). En outre, il se produit au cours du développement un changement de la source énergétique du cœur qui, à l'âge adulte, utilise principalement les acides gras et moins le glucose (Lopaschuk et al. 2010). La voie de signalisation à l'insuline joue un rôle important dans ces changements.

L'insuline se fixe sur ses récepteurs IR et recrute ensuite l'IRS-1 en le phosphorylant. L'IRS-1 phosphorylée, à son tour, phosphoryle la PI3 kinase (phosphatidylinositide 3-kinase), augmentant la quantité de PIP3 et activant des kinases dépendantes de PIP3, comme PDK-1 et Akt2. L'activation de cette voie conduit à une translocation des vésicules de stockage de GLUT4 et à la fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique, entrainant une augmentation de la pénétration du glucose au niveau du cardiomyocyte (Bertand L et al., 2008).

Au niveau cardiaque, l'environnement nutritionnel module l'action de l'insuline sur l'absorption du glucose (Abel et al. 1999), la synthèse du glycogène (Laughlin et al. 1992), la glycolyse (Depre et al. 1998), l'oxydation du glucose (Belke et al. 2001), l'inhibition de l'oxydation des acides gras (Carroll et al. 2005), la synthèse de protéines (Flaim et al. 1983) et la taille des cardiomyocytes (Belke et al. 2002).

Dans notre étude, nous avons observé une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline chez les souris SAPN à l'âge adulte. Une RC de 4 semaines a corrigé tous ces paramètres chez les souris SARC. Notre hypothèse était qu'une altération de la signalisation de l'insuline au niveau cardiaque, associée à une résistance à l'insuline, pourrait être l'origine de la dysfonction cardiaque chez les souris SAPN. Les mesures d'expression protéique du récepteur insuline (IRβ) et d'expression génique d'IRS1 et GLUT4 ne montrent aucune différence entre les 4 groupes de souris. Des modifications dans la signalisation de l'insuline cardiaque ont été observées par d'autres équipes, au sevrage chez le rat et la souris juvéniles ayant subi une SAPN (Pereira et al. 2006, Bernardo et al. 2016). A l'âge adulte, une augmentation d'IRβ et une diminution de la phosphorylation d'IRS1 ont été observés chez les souris Swiss à 4 mois (Vieira et al. 2015) et à 5 mois (Martins et al. 2008). Dans notre étude, nous n'avons pas observé de tels types de modifications chez nos souris C57BL6 à 7 mois. Toutefois, d'autres

mesures, telles que celles du niveau de phosphorylation d'IRβ et d'IRS1 et la translocation membranaire du GLUT4, seraient nécessaires pour approfondir notre compréhension et conclure de manière définitive.

Dans ces circonstances et au niveau des volets biochimiques, il est important de rappeler que la leptine est une hormone secrétée par les adipocytes qui agit comme un modulateur essentiel de la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel. La fixation du récepteur à la leptine (OB-Rb) par son ligand, conduit à l'activation de JAK suivie par la phosphorylation de la protéine STAT3 sur un résidu tyrosine, qui est transporté ensuite vers le noyau afin d'activer la transcription de gènes cibles. La surexpression de STAT3 au niveau du cardiomyocyte chez les souris peut conduire à une hypertrophie cardiaque (Kunisada et al. 2000). L'activation de la voie JAK2/STAT3 stimule la transcription de SOCS3 (suppressor of cytokine signaling proteins), un inhibiteur par rétrocontrôle de cette voie induite par la leptine. Une hyperleptinemie est systématiquement observée chez les animaux ayant eu une SAPN au sevrage et à l'âge adulte. Si, comme nous l'avons déjà évoqué, une résistance centrale à la leptine a été montrée au niveau hypothalamique (Schmidt et al. 2001, Lopez et al. 2005, Rajia et al. 2010, Rodrigues et al. 2011), des résultats similaires ont été observés au niveau du rein : une diminution de la phosphorylation de STAT3 et une augmentation d'expression de SOCS 3 ont été observées au niveau rénal chez le rat SAPN (Alcazar et al. 2012).

Il a été démontré la présence de récepteurs à la leptine au niveau cardiaque, tels qu'Ob-Ra, Ob-Rb et Ob-Re, suggérant une action locale de la leptine au niveau du myocarde (Purdham et al. 2004). Dans notre étude, nous n'avons observé aucune différence de la phosphorylation de STAT3 entre les souris SAPN et les souris contrôles. Une étude chez le rat avait néanmoins montré, au sevrage, une augmentation d'expression protéique d'Ob-Rb, STAT3 et JAK2 induite par la SAPN. De plus, dans des résultats précédents publiés par notre équipe, il était observé une diminution de la phosphorylation de STAT3 et une augmentation d'expression de SOCS3 chez les souris SAPN à l'âge de 7 mois (Habbout et al. 2013). Malgré l'absence de différence significative, nous avons cependant observé une tendance similaire à la diminution de la phosphorylation de STAT3 chez les souris SAAL à 7 mois. Ces résultats nécessiteraient d'être confirmés sur un nombre plus important d'échantillons, et en incluant l'évaluation d'expression de SOCS3 et de JAK2. Toutefois, un résultat intéressant de notre travail est l'augmentation de la phosphorylation de STAT3 observée dans tous les groupes ayant subi une RC. STAT3 est également impliqué dans la voie de signalisation « SAFE », qui joue un rôle important dans la cardioprotection vis-à-vis des lésions d'ischémie-reperfusion (Boengler et al. 2008). STAT3 est activé par les pré- et post-conditionnement ischémiques (Hattori et al. 2001) ainsi que par différents agents pharmacologiques cardioprotecteurs (Kelly et al. 2010). Nous suggérons donc que l'augmentation de la phosphorylation de

STAT3 induite par la RC pourrait activer la voie de signalisation de cardioprotection « SAFE » et améliorer la sensibilité myocardique aux lésions d'ischémie-reperfusion. Cependant, d'autres mécanismes pourraient être induits par la RC et entrainer des d'effets bénéfiques chez les souris SAPN.

L'AMPK est un régulateur important du métabolisme cardiaque et de l'adaptation métabolique, notamment lors de changements de source énergique au niveau du cœur. Elle est activée par l'hypoxie, la diminution de la phosphorylation oxydative ou l'altération du ratio AMP/ATP. Une fois activée, l'AMPK participe au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire en contrôlant, à court terme, l'activité de certaines enzymes et à long terme, l'expression de certains gènes, la plupart impliqués dans le métabolisme énergétique (Foretz et al. 2006). Il a été montré une augmentation du ratio pAMPK/AMPK chez les souris SAPN au sevrage, accompagnée d'une augmentation d'expression de GLUT1 et de l'oxydation des hydrates de carbone au niveau du tissu cardiaque (Bernardo et al. 2016). Dans ce contexte, il serait important d'aborder les mécanismes moléculaires susceptibles d'être impliqués de manière directe et indirecte dans les adaptations métaboliques qui participent aux incidences fonctionnelles cardiovasculaires qui accompagnent la RC.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats confirment que la SAPN induit un mécanisme de programmation du risque cardio-métabolique. Notre étude a démontré que les souris SAPN ne présentaient pas seulement à l'âge adulte un surpoids acquis, mais également des modifications métaboliques telles que l'accumulation de graisses, une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose. En outre, les souris SAPN développaient une dysfonction cardiaque qui s'installe progressivement au cours de leur développement postnatal et qui se caractérise, dès l'âge de 6 mois, par une dilatation de la cavité du ventricule gauche, une diminution de la FEVG, une majoration du stress oxydant au niveau cardiaque ainsi qu'une plus grande susceptibilité aux lésions d'ischémie-reperfusion myocardique. La question majeure que nous nous sommes posée au cours de travail de Thèse, a été d'évaluer si cette « programmation » du risque, peut dans une certaine mesure être « déprogrammée » par des changements nutritionnels instaurés alors que les désordres et les risques cardio-métaboliques sont installés. Nous avons alors procédé à une restriction calorique modérée (-20%), ce qui correspondait globalement au niveau du surpoids et de surconsommation de nourriture, et entrepris cette restriction sur un temps court, mais suffisant pour permettre aux souris SAPN de retrouver le niveau pondéral de leurs témoins. Sans revenir en détail sur les résultats de ce travail, qui ont été précédemment présentés et discutés, cette RC modérée a non seulement permis de normaliser le poids corporel chez les souris SA, mais elle a aussi amélioré *in vivo* la sensibilité des animaux au glucose et à l'insuline. Par ailleurs, la RC a permis de normaliser les altérations morphologiques et fonctionnelles cardiaques induites par la SAPN. Enfin, la RC a permis d'induire une diminution du niveau du stress nitro-oxydant cardiaque et une optimisation de la respiration mitochondriale chez les souris SAPN. Ces modifications sont susceptibles, au moins en partie, de participer à l'amélioration de la fonction cardiaque et à une meilleure récupération face à une situation d'ischémie-reperfusion.

Dans ce travail de Thèse, bien que de nombreuses pistes aient été explorées afin d'aborder les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets de programmation cardiaque et d'amélioration par la RC, il serait hasardeux, à la lumière de nos résultats actuels, de dégager une voie prioritaire parmi les différents pistes moléculaires. Il serait en effet séduisant de relier, à un acteur clef, l'ensemble des changements complexes et interactifs qui touchent, sur le plan spatial et temporel, la fonctionnalité d'un organe. Toutefois, si le cardiomyocyte est la cellule principale du cœur, sans laquelle il ne pourrait exercer ses propriétés contractiles rythmiques, il faut intégrer les interactions entre les différentes cellules qui structurent le myocarde (musculaires lisses, endothéliales, fibroblastes). Dans ce contexte, lors d'analyses d'expression géniques et moléculaires, force est de considérer que c'est l'ensemble des constituants de ces cellules qui est appréhendé. Il est possible que des changements affectant seulement

un type cellulaire, et qui participent de façon majeure à l'initiation de dysfonctions cardiaques soient masqués par les différentes altérations qui se superposent et qui peuvent même interagir de manière synergique ou antagoniste. En outre, la capacité contractile du cœur dépend non seulement de la fonction de l'ensemble des cardiomyocytes, synchronisés, sous-tendue par un réseau de perfusion capillaire micro-vasculaire, mais aussi de l'organisation tridimensionnelle de ces cellules, au sein d'une matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire, composée de collagène et des protéines, se structure et évolue au cours du développement de l'individu, et soutient l'activité mécanique de contraction et de relaxation de l'organe.

Dans des travaux précédemment réalisés, nous avions comparé l'expression génique des cœurs juvéniles (au sevrage) de souris SAPN et témoins, et avions observé que la SAPN était capable de modifier l'expression d'un grand nombre de gènes (548). Une proportion importante de ces modifications concernait des protéines impliquées dans la constitution du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire. Ces modifications précoces pourraient être responsables d'un « remodelage » cardiaque spécifique qui aboutirait progressivement à une dysfonction cardiaque à l'âge adulte, sans que l'on puisse alors déceler des changements d'expression de gènes ou de protéines au sein de l'ensemble des cellules du cœur mature.

Lorsqu'on évoque la situation de « programmation » périnatale du risque cardiovasculaire, le concept de changements d'ordre épigénétique se doit d'être évoqué. Nous n'avons pas dans ce travail de Thèse procédé à ce type d'études pour apprécier de quelle manière des méthylations géniques, expressions de microARN, ou modifications d'histones aient pu s'établir dans notre modèle. Il apparait judicieux que des explorations de ces mécanismes puissent être entreprises. Dans cet objectif, une collaboration scientifique sur cette thématique a été initiée avec l'équipe d'Umberto Siméoni (CHUV, Lausanne) et des résultats préliminaires particulièrement encourageants tendent à démontrer l'implication, au niveau cardiaque, de microARN tel le MIR193b, connu pour réguler des mécanismes reliés à l'inflammasome. Dans ce contexte de réflexion sur les processus qui sous-tendent les adaptations métaboliques et fonctionnelles, il serait intéressant d'aborder les modifications épigénétiques qui touchent STAT3, étant donné son rôle charnière dans les mécanismes de signalisation intracellulaire, de production énergétique mitochondriale et de devenir des cardiomyocytes. Ces actions touchent essentiellement les cellules myocardiques lors de l'initiation des processus inflammatoires. Nous faisons l'hypothèse qu'au cours du mécanisme de programmation périnatale par la SAPN, STAT3 pourrait jouer un rôle majeur au niveau cardiaque et moduler les réponses inflammatoires, le remodelage et la fibrose cardiaques à l'âge adulte. Aussi des travaux à venir devront s'orienter sur

l'étude de la voie de régulation de STAT3 au niveau cardiaque à différentes étapes du développement de l'animal. Ce volet aura également pour objectif d'explorer quels mécanismes de régulation de son expression sont affectés par la SAPN, et notamment si ces changements font appel à des méthylation de son promoteur ou à l'expression de microARN de régulation.

En conclusion, nos résultats suggèrent que des mesures nutritionnelles appropriées à l'âge adulte pourraient permettre d'infléchir certains aspects délétères de la programmation précoce du risque cardio-vasculaire et reverser les dysfonctionnements cardiaques, métaboliques et oxydatifs associée à la suralimentation post-natale. D'autres études seront nécessaires afin d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets bénéfiques de la « modération calorique » sur l'ensemble des facteurs qui caractérisent le risque cardio-métabolique.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe Y., Ono K., Kawamura T., Wada H., Kita T., Shimatsu A. and Hasegawa K. (2007). "Leptin induces elongation of cardiac myocytes and causes eccentric left ventricular dilatation with compensation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(5): H2387-2396.
Abel E.D., Kaulbach H.C., Tian R., Hopkins J.C., Duffy J., Doetschman T., Minnemann T., Boers M.E., Hadro E., Oberste-Berghaus C., Quist W., Lowell B.B., Ingwall J.S. and Kahn B.B. (1999). "Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart." J Clin Invest **104**(12): 1703-1714.
Abete P., Testa G., Ferrara N., De Santis D., Capaccio P., Viati L., Calabrese C., Cacciatore F., Longobardi G., Condorelli M., Napoli C. and Rengo F. (2002). "Cardioprotective effect of ischemic preconditioning is preserved in food-restricted senescent rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(6): H1978-1987.
Abete P., Testa G., Galizia G., Mazzella F., Della Morte D., de Santis D., Calabrese C., Cacciatore F., Gargiulo G., Ferrara N., Rengo G., Sica V., Napoli C. and Rengo F. (2005). "Tandem action of exercise training and food restriction completely preserves ischemic preconditioning in the aging heart." Exp Gerontol **40**(1-2): 43-50.
Achard V., Sanchez C., Tassistro V., Verdier M., Alessi M.C. and Grino M. (2015). "Immediate Postnatal Overfeeding in Rats Programs Aortic Wall Structure Alterations and Metalloproteinases Dysregulation in Adulthood." Am J Hypertens.
Agote M., Goya L., Ramos S., Alvarez C., Gavete M.L., Pascual-Leone A.M. and Escriva F. (2001). "Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **281**(5): E1101-1109.
Ahmet I., Wan R., Mattson M.P., Lakatta E.G. and Talan M. (2005). "Cardioprotection by intermittent fasting in rats." Circulation **112**(20): 3115-3121.
Alcazar M.A., Boehler E., Rother E., Amann K., Vohlen C., von Horsten S., Plank C. and Dotsch J. (2012). "Early postnatal hyperalimentation impairs renal function via SOCS-3 mediated renal postreceptor leptin resistance." Endocrinology **153**(3): 1397-1410.
Allcock D.M., Gardner M.J. and Sowers J.R. (2009). "Relation between childhood obesity and adult cardiovascular risk." International journal of pediatric endocrinology **2009**(1): 1.
Alpert M.A. (2001). "Obesity Cardiomyopathy:: Pathophysiology and Evolution of the Clinical Syndrome." The American journal of the medical sciences **321**(4): 225-236.
Anson R.M., Guo Z.H., de Cabo R., Iyun T., Rios M., Hagepanos A., Ingram D.K., Lane M.A. and Mattson M.P. (2003). "Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(10): 6216-6220.
Antoniades C., Antonopoulos A.S., Tousoulis D. and Stefanadis C. (2009). "Adiponectin: from obesity to cardiovascular disease." Obes Rev **10**(3): 269-279.
Argentino D.P., Dominici F.P., Al-Regaiey K., Bonkowski M.S., Bartke A. and Turyn D. (2005). "Effects of long-term caloric restriction on early steps of the insulin-signaling system in mouse skeletal muscle." Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences **60**(1): 28-34.
Argentino D.P., Dominici F.P., Munoz M.C., Al-Regaiey K., Bartke A. and Turyn D. (2005). "Effects of long-term caloric restriction on glucose homeostasis and on the first steps of the insulin signaling system in skeletal muscle of normal and Ames dwarf (Prop1(df)/Prop1(df)) mice." Experimental Gerontology **40**(1-2): 27-35.
Arita Y., Kihara S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., Hotta K., Shimomura I., Nakamura T., Miyaoka K., Kuriyama H., Nishida M., Yamashita S., Okubo K., Matsubara K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Funahashi T. and Matsuzawa Y. (2012). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999." Biochem Biophys Res Commun **425**(3): 560-564.

Armeni T., Principato G., Quiles J.L., Pieri C., Bompadre S. and Battino M. (2003). "Mitochondrial dysfunctions during aging: vitamin E deficiency or caloric restriction--two different ways of modulating stress." J Bioenerg Biomembr **35**(2): 181-191.
Armitage J.A., Khan I.Y., Taylor P.D., Nathanielsz P.W. and Poston L. (2004). "Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals?" J Physiol **561**(Pt 2): 355-377.
Arvidsson E., Viguerie N., Andersson I., Verdich C., Langin D. and Arner P. (2004). "Effects of Different Hypocaloric Diets on Protein Secretion From Adipose Tissue of Obese Women." Diabetes **53**(8): 1966-1971.
Ash C.E. and Merry B.J. (2011). "The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation." Mech Ageing Dev **132**(1-2): 43-54.
Aurigemma G.P., de Simone G. and Fitzgibbons T.P. (2013). "Cardiac remodeling in obesity." Circ Cardiovasc Imaging **6**(1): 142-152.
Aydin C., Ince E., Koparan S., Cangul I.T., Naziroglu M. and Ak F. (2007). "Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat." Cell Biochem Funct **25**(2): 129-137.
Aydin C., Sonat F., Sahin S.K., Cangul I.T. and Ozkaya G. (2009). "Long term dietary restriction ameliorates swimming exercise-induced oxidative stress in brain and lung of middle-aged rat." Indian J Exp Biol **47**(1): 24-31.
Babior B.M. (1999). "NADPH oxidase: an update." Blood **93**(5): 1464-1476.
Bagga D., Ashley J.M., Geffrey S.P., Wang H.J., Barnard R.J., Korenman S. and Heber D. (1995). "Effects of a very low fat, high fiber diet on serum hormones and menstrual function. Implications for breast cancer prevention." Cancer **76**(12): 2491-2496.
Bagga D., Byerley L.O., Koziol B.J., Glick Z., Ashley J.M. and Heber D. (1995). "Adipose tissue and the effects of fat and calories on breast tumorigenesis in rats." The Journal of Nutritional Biochemistry **6**(12): 667-672.
Baker J.L., Olsen L.W. and Sørensen T.I. (2007). "Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood." New England journal of medicine **357**(23): 2329-2337.
Balaban R.S., Nemoto S. and Finkel T. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-495.
Bales C.W. and Kraus W.E. (2013). "Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health." Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention **33**(4): 201.
Ballard F.B., Danforth W.H., Naegle S. and Bing R.J. (1960). "Myocardial metabolism of fatty acids." Journal of Clinical Investigation **39**(5): 717.
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): 668-673.
Barbee W.R., Kline J.A. and Watts J.A. (2000). "Depletion of lactate by dichloroacetate reduces cardiac efficiency after hemorrhagic shock." Shock **14**(2): 208-214.
Barja G. (1998). "Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birdsa." Annals of the New York Academy of Sciences **854**(1): 224-238.
Barja G. (2004). "Free radicals and aging." Trends Neurosci **27**(10): 595-600.
Barja G. and Herrero A. (2000). "Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals." The FASEB Journal **14**(2): 312-318.
Barker D., Bull A.R., Osmond C. and Simmonds S.J. (1990). "Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life." Bmj **301**(6746): 259-262.
Barker D.J. and Osmond C. (1986). "Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales." The Lancet **327**(8489): 1077-1081.

Barouch L.A., Berkowitz D.E., Harrison R.W., O'Donnell C.P. and Hare J.M. (2003). "Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice." Circulation **108**(6): 754-759.
Bartelds B., Gratama J.-W.C., Knoester H., Takens J., Smid G.B., Aarnoudse J.G., Heymans H.S. and Kuipers J.R. (1998). "Perinatal changes in myocardial supply and flux of fatty acids, carbohydrates, and ketone bodies in lambs." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **274**(6): H1962-H1969.
Barzilai N., Banerjee S., Hawkins M., Chen W. and Rossetti L. (1998). "Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat." J Clin Invest **101**(7): 1353-1361.
Barzilai N. and Gabriely I. (2001). "The role of fat depletion in the biological benefits of caloric restriction." J Nutr **131**(3): 903s-906s.
Bassett D.R. and Craig B.W. (1988). "Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats." J Appl Physiol (1985) **64**(3): 1249-1256.
Beauloye C., Bertrand L., Horman S. and Hue L. (2011). "AMPK, a potential therapeutic target against the transition from cardiac injury to heart failure." Cardiovascular research: cvr034.
Beck B. and Richy S. (2009). "Dietary modulation of ghrelin and leptin and gorging behavior after weight loss in the obese Zucker rat." J Endocrinol **202**(1): 29-34.
Bedard K. and Krause K.-H. (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiological reviews **87**(1): 245-313.
Bei F., Jia J., Jia Y.Q., Sun J.H., Liang F., Yu Z.Y. and Cai W. (2015). "Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats." Lipids Health Dis **14**: 96.
Belke D.D., Betuing S., Tuttle M.J., Graveleau C., Young M.E., Pham M., Zhang D., Cooksey R.C., McClain D.A., Litwin S.E., Taegtmeyer H., Severson D., Kahn C.R. and Abel E.D. (2002). "Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression." J Clin Invest **109**(5): 629-639.
Belke D.D., Larsen T.S. and Severson D.L. (2001). "Cardiac function in perfused hearts from diabetic mice." Adv Exp Med Biol **498**: 241-245.
Berg B.N. and Simms H.S. (1960). "Nutrition and longevity in the rat. II. Longevity and onset of disease with different levels of food intake." J Nutr **71**: 255-263.
Bergamini E., Cavallini G., Donati A. and Gori Z. (2003). "The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically." Biomed Pharmacother **57**(5-6): 203-208.
Bernardo A.F., Cortez E., Neves F.A., Vieira A.K., Soares Vde M., Rodrigues-Cunha A.C., Andrade D.C., Thole A.A., Gabriel-Costa D., Brum P.C., Moura A.S. and Garcia-Souza E.P. (2016). "Overnutrition during lactation leads to impairment in insulin signaling, up-regulation of GLUT1 and increased mitochondrial carbohydrate oxidation in heart of weaned mice." J Nutr Biochem **29**: 124-132.
Berryman D.E., Christiansen J.S., Johannsson G., Thorner M.O. and Kopchick J.J. (2008). "Role of the GH/IGF-1 axis in lifespan and healthspan: Lessons from animal models." Growth Hormone & Igf Research **18**(6): 455-471.
Bertrand H.A., Lynd F.T., Masoro E.J. and Yu B.P. (1980). "Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum or a life-prolonging restricted diet." J Gerontol **35**(6): 827-835.
Binas B., DANNEBERG H., McWHIR J., MULLINS L. and CLARK A.J. (1999). "Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization." The FASEB Journal **13**(8): 805-812.
Blondeau B., Joly B., Perret C., Prince S., Bruneval P., Lelievre-Pegorier M., Fassot C. and Duong Van Huyen J.P. (2011). "Exposure in utero to maternal diabetes leads to glucose intolerance and high blood pressure with no major effects on lipid metabolism." Diabetes Metab **37**(3): 245-251.

Boengler K., Buechert A., Heinen Y., Roeskes C., Hilfiker-Kleiner D., Heusch G. and Schulz R. (2008). "Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice." Circulation research **102**(1): 131-135.
Bogardus C., Lillioja S., Mott D., Hollenbeck C. and Reaven G. (1985). "Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man." American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism **248**(3): E286-E291.
Bordone L. and Guarente L. (2005). "Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 298-305.
Boubred F., Buffat C., Feuerstein J.M., Daniel L., Tsimaratos M., Oliver C., Lelievre-Pegorier M. and Simeoni U. (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): F1944-1949.
Boubred F., Daniel L., Buffat C., Feuerstein J.M., Tsimaratos M., Oliver C., Dignat-George F., Lelievre-Pegorier M. and Simeoni U. (2009). "Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats." Am J Physiol Renal Physiol **297**(4): F943-951.
Bouchard C. (1996). "The causes of obesity: advances in molecular biology but stagnation on the genetic front." Diabetologia **39**(12): 1532-1533.
Boudina S., Bugger H., Sena S., O'Neill B.T., Zaha V.G., Ilkun O., Wright J.J., Mazumder P.K., Palfreyman E., Tidwell T.J., Theobald H., Khalimonchuk O., Wayment B., Sheng X., Rodnick K.J., Centini R., Chen D., Litwin S.E., Weimer B.E. and Abel E.D. (2009). "Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart." Circulation **119**(9): 1272-1283.
Boudina S., Sena S., O'Neill B.T., Tathireddy P., Young M.E. and Abel E.D. (2005). "Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity." Circulation **112**(17): 2686-2695.
Boudina S., Sena S., Theobald H., Sheng X., Wright J.J., Hu X.X., Aziz S., Johnson J.I., Bugger H., Zaha V.G. and Abel E.D. (2007). "Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins." Diabetes **56**(10): 2457-2466.
Boullu-Ciocca S., Achard V., Tassistro V., Dutour A. and Grino M. (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): 669-677.
Boullu-Ciocca S., Dutour A., Guillaume V., Achard V., Oliver C. and Grino M. (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.
Boullu-Ciocca S., Tassistro V., Dutour A. and Grino M. (2015). "Pioglitazone in adult rats reverses immediate postnatal overfeeding-induced metabolic, hormonal, and inflammatory alterations." Endocrine.
Bouret S.G. and Simerly R.B. (2004). "Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits." Endocrinology **145**(6): 2621-2626.
Boveris A., Oshino N. and Chance B. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." Biochemical Journal **128**(3): 617-630.
Brand M. (2000). "Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing." Experimental gerontology **35**(6): 811-820.
Brand M.D., Affourtit C., Esteves T.C., Green K., Lambert A.J., Miwa S., Pakay J.L. and Parker N. (2004). "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins." Free Radical Biology and Medicine **37**(6): 755-767.
Bravo P.E., Morse S., Borne D.M., Aguilar E.A. and Reisin E. (2006). "Leptin and hypertension in obesity." Vasc Health Risk Manag **2**(2): 163-169.

Breese C.R., Ingram R.L. and Sonntag W.E. (1991). "Influence of Age and Long-Term Dietary Restriction on Plasma Insulin-Like Growth Factor-I (Igf-1), Igf-1 Gene-Expression, and Igf-1 Binding-Proteins." Journals of Gerontology **46**(5): B180-B187.
Broderick T.L., Belke T. and Driedzic W.R. (2002). "Effects of chronic caloric restriction on mitochondrial respiration in the ischemic reperfused rat heart." Mol Cell Biochem **233**(1-2): 119-125.
Broderick T.L., Driedzic W.R., Gillis M., Jacob J. and Belke T. (2001). "Effects of chronic food restriction and exercise training on the recovery of cardiac function following ischemia." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(1): B33-37.
Burrell J.H., Boyn A.M., Kumarasamy V., Hsieh A., Head S.I. and Lumbers E.R. (2003). "Growth and maturation of cardiac myocytes in fetal sheep in the second half of gestation." The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology **274**(2): 952-961.
Cabelof D.C., Yanamadala S., Raffoul J.J., Guo Z.M., Soofi A. and Heydari A.R. (2003). "Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision, repair and reversal of its age-related decline." DNA Repair **2**(3): 295-307.
Cadenas S., Rojas C., Perezcampo R., Lopeztorres M. and Barja G. (1994). "Caloric and Carbohydrate Restriction in the Kidney - Effects on Free-Radical Metabolism." Experimental Gerontology **29**(1): 77-88.
Cai G., Ziko I., Barwood J., Soch A., Sominsky L., Molero J.C. and Spencer S.J. (2016). "Overfeeding during a critical postnatal period exacerbates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge: a role for adrenal melanocortin 2 receptors." Sci Rep **6**: 21097.
Canto C. and Auwerx J. (2009). "Caloric restriction, SIRT1 and longevity." Trends Endocrinol Metab **20**(7): 325-331.
Carantoni M., Zuliani G., Volpato S., Palmieri E., Mezzetti A., Vergnani L. and Fellin R. (1998). "Relationships between fasting plasma insulin, anthropometrics, and metabolic parameters in a very old healthy population. Associazione Medica Sabin." Metabolism **47**(5): 535-540.
Carr D.B., Utzschneider K.M., Hull R.L., Kodama K., Retzlaff B.M., Brunzell J.D., Shofer J.B., Fish B.E., Knopp R.H. and Kahn S.E. (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): 2087-2094.
Carroll L., Voisey J. and van Daal A. (2004). "Mouse models of obesity." Clin Dermatol **22**(4): 345-349.
Carroll R., Carley A.N., Dyck J.R. and Severson D.L. (2005). "Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts." Am J Physiol Endocrinol Metab **288**(5): E900-906.
Castello L., Froio T., Cavallini G., Biasi F., Sapino A., Leonarduzzi G., Bergamini E., Poli G. and Chiarpotto E. (2005). "Calorie restriction protects against age-related rat aorta sclerosis." FASEB J **19**(13): 1863-1865.
Chan W., Krieg R.J., Sayles T.E. and Matt D.W. (1993). "Caloric Restriction and Expression of Liver Insulin-Like Growth Factor-I, Growth-Hormone Receptor and Pituitary Growth-Hormone." Nutrition Research **13**(11): 1343-1350.
Chance B., Sies H. and Boveris A. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiological reviews **59**(3): 527-605.
Chen L.H., SaxonKelley D.M. and Snyder D.L. (1996). "Effects of age and dietary restriction on liver endogenous antioxidant defenses in male Lobund-Wistar rats." Age **19**(3): 101-109.
Chiarpotto E., Bergamini E. and Poli G. (2006). "Molecular mechanisms of calorie restriction's protection against age-related sclerosis." IUBMB Life **58**(12): 695-702.
Clarke M.A., Stefanidis A. and Spencer S.J. (2012). "Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life." J Neuroendocrinol **24**(3): 511-524.
Clubb F.J., Penney D.G., Baylerian M.S. and Bishop S.P. (1986). "Cardiomegaly due to myocyte hyperplasia in perinatal rats exposed to 200 ppm carbon monoxide." Journal of molecular and cellular cardiology **18**(5): 477-486.

Colom B., Oliver J., Roca P. and Garcia-Palmer F.J. (2007). "Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H2O2 production and oxidative damage." Cardiovascular research **74**(3): 456-465.
Combs T.P., Berg A.H., Rajala M.W., Klebanov S., Iyengar P., Jimenez-Chillaron J.C., Patti M.E., Klein S.L., Weinstein R.S. and Scherer P.E. (2003). "Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin." Diabetes **52**(2): 268-276.
Conceicao E.P., Franco J.G., Oliveira E., Resende A.C., Amaral T.A., Peixoto-Silva N., Passos M.C., Moura E.G. and Lisboa P.C. (2013). "Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance." J Nutr Biochem **24**(1): 81-87.
Conceicao E.P., Moura E.G., Carvalho J.C., Oliveira E. and Lisboa P.C. (2015). "Early redox imbalance is associated with liver dysfunction at weaning in overfed rats." J Physiol **593**(21): 4799-4811.
Conceicao E.P., Moura E.G., Trevenzoli I.H., Peixoto-Silva N., Pinheiro C.R., Younes-Rapozo V., Oliveira E. and Lisboa P.C. (2013). "Neonatal overfeeding causes higher adrenal catecholamine content and basal secretion and liver dysfunction in adult rats." Eur J Nutr **52**(4): 1393-1404.
Corbi G., Conti V., Scapagnini G., Filippelli A. and Ferrara N. (2012). "Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging." Front Biosci (Elite Ed) **4**: 768-778.
Correia M.L., Morgan D.A., Sivitz W.I., Mark A.L. and Haynes W.G. (2001). "Leptin acts in the central nervous system to produce dose-dependent changes in arterial pressure." Hypertension **37**(3): 936-942.
Coutinho T., Goel K., de Sá D.C., Kragelund C., Kanaya A.M., Zeller M., Park J.-S., Kober L., Torp-Pedersen C. and Cottin Y. (2011). "Central obesity and survival in subjects with coronary artery disease: a systematic review of the literature and collaborative analysis with individual subject data." Journal of the American College of Cardiology **57**(19): 1877-1886.
Csiszar A., Labinskyy N., Jimenez R., Pinto J.T., Ballabh P., Losonczy G., Pearson K.J., de Cabo R. and Ungvari Z. (2009). "Anti-oxidative and anti-inflammatory vasoprotective effects of caloric restriction in aging: role of circulating factors and SIRT1." Mech Ageing Dev **130**(8): 518-527.
Cunha A.C., Pereira R.O., Pereira M.J., Soares Vde M., Martins M.R., Teixeira M.T., Souza E.P. and Moura A.S. (2009). "Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2." J Nutr Biochem **20**(6): 435-442.
Danesh J., Whincup P., Walker M., Lennon L., Thomson A., Appleby P., Gallimore J.R. and Pepys M.B. (2000). "Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses." BMJ **321**(7255): 199-204.
Davidowa H., Heidel E. and Plagemann A. (2002). "Differential involvement of dopamine D1 and D2 receptors and inhibition by dopamine of hypothalamic VMN neurons in early postnatally overfed juvenile rats." Nutr Neurosci **5**(1): 27-36.
Davidowa H., Li Y. and Plagemann A. (2003). "Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats." Eur J Neurosci **18**(3): 613-621.
Davidowa H. and Plagemann A. (2000). "Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats." Neuroreport **11**(12): 2795-2798.
Davidowa H. and Plagemann A. (2000). "Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats." Neurosci Lett **293**(1): 21-24.
Davidowa H. and Plagemann A. (2001). "Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding." Neuroreport **12**(15): 3201-3204.
Davidowa H. and Plagemann A. (2004). "Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones." Neurosci Lett **371**(1): 64-68.
Davidowa H. and Plagemann A. (2007). "Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats." Neuroreport **18**(5): 521-524.

De Schutter A., Lavie C.J. and Milani R.V. (2014). "The impact of obesity on risk factors and prevalence and prognosis of coronary heart disease-the obesity paradox." Prog Cardiovasc Dis **56**(4): 401-408.
de Simone G., Palmieri V., Bella J.N., Celentano A., Hong Y., Oberman A., Kitzman D.W., Hopkins P.N., Arnett D.K. and Devereux R.B. (2002). "Association of left ventricular hypertrophy with metabolic risk factors: the HyperGEN study." J Hypertens **20**(2): 323-331.
Del Roso A., Vittorini S., Cavallini G., Donati A., Gori Z., Masini M., Pollera M. and Bergamini E. (2003). "Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis." Experimental Gerontology **38**(5): 519-527.
Delemasure S., Sicard P., Lauzier B., Moreau D., Vergely C. and Rochette L. (2007). "Acute administration of epirubicin induces myocardial depression in isolated rat heart and production of radical species evaluated by electron spin resonance Spectroscopy." Journal of Cardiovascular Pharmacology **50**(6): 647-653.
Depre C., Rider M.H. and Hue L. (1998). "Mechanisms of control of heart glycolysis." Eur J Biochem **258**(2): 277-290.
Dhahbi J.M., Tsuchiya T., Kim H.J., Mote P.L. and Spindler S.R. (2006). "Gene expression and physiologic responses of the heart to the initiation and withdrawal of caloric restriction." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **61**(3): 218-231.
Di Angelantonio E., Sarwar N., Perry P., Kaptoge S., Ray K.K., Thompson A., Wood A.M., Lewington S., Sattar N., Packard C.J., Collins R., Thompson S.G. and Danesh J. (2009). "Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease." Jama **302**(18): 1993-2000.
Di Bello V., Santini F., Di Cori A., Pucci A., Palagi C., Delle Donne M.G., Fierabracci P., Marsili A., Talini E. and Giannetti M. (2006). "Obesity cardiomyopathy: is it a reality? An ultrasonic tissue characterization study." Journal of the American Society of Echocardiography **19**(8): 1063-1071.
Ding G., Qin Q., He N., Francis-David S.C., Hou J., Liu J., Ricks E. and Yang Q. (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., Davies M.J., Schriver S.D., Lauterio T.J. and Prewitt R.L. (2001). "Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension." Hypertension **37**(2 Pt 2): 554-560.
Dong M. and Ren J. (2014). "What fans the fire: insights into mechanisms of leptin in metabolic syndrome-associated heart diseases." Curr Pharm Des **20**(4): 652-658.
Dörner D. (1976). "Problemlösen als informationsverarbeitung."
Dorner G. and Plagemann A. (1994). "Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life." Horm Metab Res **26**(5): 213-221.
Du Q., Hosoda H., Umekawa T., Kinouchi T., Ito N., Miyazato M., Kangawa K. and Ikeda T. (2015). "Postnatal weight gain induced by overfeeding pups and maternal high-fat diet during the lactation period modulates glucose metabolism and the production of pancreatic and gastrointestinal peptides." Peptides **70**: 23-31.
Dunbar J.C. and Lu H. (1999). "Leptin-induced increase in sympathetic nervous and cardiovascular tone is mediated by proopiomelanocortin (POMC) products." Brain research bulletin **50**(3): 215-221.
Duong Van Huyen J.P., Vessieres E., Perret C., Troise A., Prince S., Guihot A.L., Barbry P., Henrion D., Bruneval P., Laurent S., Lelievre-Pegorier M. and Fassot C. (2010). "In utero exposure to maternal diabetes impairs vascular expression of prostacyclin receptor in rat offspring." Diabetes **59**(10): 2597-2602.
Duzguncinar O., Yavuz B., Hazirolan T., Deniz A., Tokgozoglu S.L., Akata D. and Demirpence E. (2008). "Plasma myeloperoxidase is related to the severity of coronary artery disease." Acta Cardiol **63**(2): 147-152.

Edwards A.G., Donato A.J., Lesniewski L.A., Gioscia R.A., Seals D.R. and Moore R.L. (2010). "Life-long caloric restriction elicits pronounced protection of the aged myocardium: a role for AMPK." Mechanisms of ageing and development **131**(11): 739-742.
Ellis A. and Triggle C.R. (2003). "Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone." Canadian journal of physiology and pharmacology **81**(11): 1013-1028.
Field A.E., Coakley E.H., Must A., Spadano J.L., Laird N., Dietz W.H., Rimm E. and Colditz G.A. (2001). "Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period." Arch Intern Med **161**(13): 1581-1586.
Flaim K.E., Kochel P.J., Kira Y., Kobayashi K., Fossel E.T., Jefferson L.S. and Morgan H.E. (1983). "Insulin effects on protein synthesis are independent of glucose and energy metabolism." Am J Physiol **245**(1): C133-143.
Fontana L. (2008). "Calorie restriction and cardiometabolic health." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **15**(1): 3-9.
Fontana L., Meyer T.E., Klein S. and Holloszy J.O. (2004). "Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6659-6663.
Fontana L., Villareal D.T., Weiss E.P., Racette S.B., Steger-May K., Klein S. and Holloszy J.O. (2007). "Calorie restriction or exercise: effects on coronary heart disease risk factors. A randomized, controlled trial." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(1): E197-202.
Foretz M., Taleux N., Guigas B., Horman S., Beauloye C., Andreelli F., Bertrand L. and Viollet B. (2006). "[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]." Med Sci (Paris) **22**(4): 381-388.
Franks P.W., Brage S., Luan J., Ekelund U., Rahman M., Farooqi I.S., Halsall I., O'Rahilly S. and Wareham N.J. (2005). "Leptin predicts a worsening of the features of the metabolic syndrome independently of obesity." Obes Res **13**(8): 1476-1484.
Frederich R.C., Hamann A., Anderson S., Lollmann B., Lowell B.B. and Flier J.S. (1995). "Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action." Nat Med **1**(12): 1311-1314.
Frederich R.C., Lollmann B., Hamann A., Napolitano-Rosen A., Kahn B.B., Lowell B.B. and Flier J.S. (1995). "Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity." J Clin Invest **96**(3): 1658-1663.
Fredersdorf S., Thumann C., Ulucan C., Griese D.P., Luchner A., Riegger G.A., Kromer E.P. and Weil J. (2004). "Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats." Cardiovasc Pathol **13**(1): 11-19.
Freeman B.A. and Crapo J.D. (1981). "Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria." J Biol Chem **256**(21): 10986-10992.
Freeman B.A., Young S.L. and Crapo J. (1983). "Liposome-mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury." Journal of Biological Chemistry **258**(20): 12534-12542.
Fryar C.D., Carroll M.D. and Ogden C.L. (2012). "Prevalence of obesity among children and adolescents: United States, trends 1963–1965 through 2009–2010." National Center for Health Statistics **1960**.
Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M. and Shimomura I. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." J Clin Invest **114**(12): 1752-1761.
Galili O., Versari D., Sattler K.J., Olson M.L., Mannheim D., McConnell J.P., Chade A.R., Lerman L.O. and Lerman A. (2007). "Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H904-911.

Garrison R.J., Kannel W.B., Stokes J. and Castelli W.P. (1987). "Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study." Preventive medicine **16**(2): 235-251.
Ghantous C.M., Azrak Z., Hanache S., Abou-Kheir W. and Zeidan A. (2015). "Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System." Int J Endocrinol **2015**: 534320.
Gillman M.W., Rifas-Shiman S.L., Kleinman K., Oken E., Rich-Edwards J.W. and Taveras E.M. (2008). "Developmental origins of childhood overweight: potential public health impact." Obesity (Silver Spring) **16**(7): 1651-1656.
Gladden L. (2004). "Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium." The Journal of physiology **558**(1): 5-30.
Glavas M.M., Kirigiti M.A., Xiao X.Q., Enriori P.J., Fisher S.K., Evans A.E., Grayson B.E., Cowley M.A., Smith M.S. and Grove K.L. (2010). "Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet." Endocrinology **151**(4): 1598-1610.
Godfrey K.M. and Barker D.J. (2000). "Fetal nutrition and adult disease." Am J Clin Nutr **71**(5 Suppl): 1344s-1352s.
Goodwin G.W., Taylor C.S. and Taegtmeyer H. (1998). "Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work." Journal of Biological Chemistry **273**(45): 29530-29539.
Gredilla R., Sanz A., Lopez-Torres M. and Barja G. (2001). "Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart." Faseb j **15**(9): 1589-1591.
Grundy S.M., Cleeman J.I., Daniels S.R., Donato K.A., Eckel R.H., Franklin B.A., Gordon D.J., Krauss R.M., Savage P.J., Smith S.C., Jr., Spertus J.A. and Fernando C. (2005). "Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary." Crit Pathw Cardiol **4**(4): 198-203.
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 in Cardiovascular Medicine **17**(8): 275-283.
Guenancia C., Li N., Hachet O., Rigal E., Cottin Y., Dutartre P., Rochette L. and Vergely C. (2015). "Paradoxically, iron overload does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro in cardiomyocytes and in vivo in mice." Toxicol Appl Pharmacol.
Gustafson B. (2010). "Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis." Journal of atherosclerosis and thrombosis **17**(4): 332-341.
Gutteridge J.M. and Halliwell B. (1993). "Invited review free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence." Free radical research communications **19**(3): 141-158.
Guzik T.J., Mussa S., Gastaldi D., Sadowski J., Ratnatunga C., Pillai R. and Channon K.M. (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): 1656-1662.
Haass M., Kitzman D.W., Anand I.S., Miller A., Zile M.R., Massie B.M. and Carson P.E. (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." Circulation: Heart Failure **4**(3): 324-331.
Habbout A., Delemasure S., Goirand F., Guilland J.C., Chabod F., Sediki M., Rochette L. and Vergely C. (2012). "Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood." Biochimie **94**(1): 117-124.
Habbout A., Guenancia C., Lorin J., Rigal E., Fassot C., Rochette L. and Vergely C. (2013). "Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters." PLoS One **8**(2): e56981.
Habbout A., Li N., Rochette L. and Vergely C. (2013). "Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences." J Nutr **143**(5): 553-562.

Haghikia A., Ricke-Hoch M., Stapel B., Gorst I. and Hilfiker-Kleiner D. (2014). "STAT3, a key regulator of cell-to-cell communication in the heart." Cardiovasc Res **102**(2): 281-289.
Han X., Turdi S., Hu N., Guo R., Zhang Y. and Ren J. (2012). "Influence of long-term caloric restriction on myocardial and cardiomyocyte contractile function and autophagy in mice." J Nutr Biochem **23**(12): 1592-1599.
Hardie D.G. (2011). "AMP-activated protein kinase—an energy sensor that regulates all aspects of cell function." Genes & development **25**(18): 1895-1908.
Hattori R., Maulik N., Otani H., Zhu L., Cordis G., Engelman R.M., Siddiqui M. and Das D.K. (2001). "Role of STAT3 in ischemic preconditioning." Journal of molecular and cellular cardiology **33**(11): 1929-1936.
Heidel E., Plagemann A. and Davidowa H. (1999). "Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats." Neuroreport **10**(9): 1827-1831.
Heilbronn L.K. and Ravussin E. (2003). "Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans." Am J Clin Nutr **78**(3): 361-369.
Horman S., Beauloye C., Vanoverschelde J.-L. and Bertrand L. (2012). "AMP-activated protein kinase in the control of cardiac metabolism and remodeling." Current heart failure reports **9**(3): 164-173.
Horwich T.B. and Fonarow G.C. (2010). "Glucose, obesity, metabolic syndrome, and diabetes: relevance to incidence of heart failure." Journal of the American College of Cardiology **55**(4): 283-293.
Hou M., Liu Y., Zhu L., Sun B., Guo M., Buren J. and Li X. (2011). "Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats." PLoS One **6**(11): e25726.
Howie G.J., Sloboda D.M., Kamal T. and Vickers M.H. (2009). "Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet." J Physiol **587**(Pt 4): 905-915.
Hu P., Zhang D., Swenson L., Chakrabarti G., Abel E.D. and Litwin S.E. (2003). "Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(3): H1261-1269.
Hutley L. and Prins J.B. (2005). "Fat as an endocrine organ: relationship to the metabolic syndrome." Am J Med Sci **330**(6): 280-289.
James D.E., Strube M. and Muecdler M. (1989). "Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter."
Ji C., Dai Y., Jiang W., Liu J., Hou M., Wang J., Buren J. and Li X. (2014). "Postnatal overfeeding promotes early onset and exaggeration of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through disordered hepatic lipid metabolism in rats." J Nutr Biochem **25**(11): 1108-1116.
Jia G.H., DeMarco V.G. and Sowers J.R. (2016). "Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy." Nature Reviews Endocrinology **12**(3): 144-153.
Johar S., Cave A.C., Narayanapanicker A., Grieve D.J. and Shah A.M. (2006). "Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase." FASEB J **20**(9): 1546-1548.
Judge S., Judge A., Grune T. and Leeuwenburgh C. (2004). "Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **286**(2): R254-R259.
Jun J.Y., Ma Z., Pyla R. and Segar L. (2012). "Leptin treatment inhibits the progression of atherosclerosis by attenuating hypercholesterolemia in type 1 diabetic Ins2(+/Akita):apoE(-/-) mice." Atherosclerosis **225**(2): 341-347.
Kadowaki T., Hara K., Yamauchi T., Terauchi Y., Tobe K. and Nagai R. (2003). "Molecular mechanism of insulin resistance and obesity." Exp Biol Med (Maywood) **228**(10): 1111-1117.
Kandasamy A.D., Chow A.K., Ali M.A. and Schulz R. (2010). "Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix." Cardiovasc Res **85**(3): 413-423.

Kang K.W., Kim O.S., Chin J.Y., Kim W.H., Park S.H., Choi Y.J., Shin J.H., Jung K.T., Lim do S. and Lee S.K. (2015). "Diastolic Dysfunction Induced by a High-Fat Diet Is Associated with Mitochondrial Abnormality and Adenosine Triphosphate Levels in Rats." Endocrinol Metab (Seoul) **30**(4): 557-568.
Kang S.W., Chae H.Z., Seo M.S., Kim K., Baines I.C. and Rhee S.G. (1998). "Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha." J Biol Chem **273**(11): 6297-6302.
KANNEL W.B., BRAND N., SKINNER J.J., DAWBER T.R. and MCNAMARA P.M. (1967). "The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension: the Framingham study." Annals of internal medicine **67**(1): 48-59.
Kappeler L., De Magalhaes Filho C., Leneuve P., Xu J., Brunel N., Chatziantoniou C., Le Bouc Y. and Holzenberger M. (2009). "Early postnatal nutrition determines somatotropic function in mice." Endocrinology **150**(1): 314-323.
Kastelein J.J., van der Steeg W.A., Holme I., Gaffney M., Cater N.B., Barter P., Deedwania P., Olsson A.G., Boekholdt S.M., Demicco D.A., Szarek M., LaRosa J.C., Pedersen T.R. and Grundy S.M. (2008). "Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment." Circulation **117**(23): 3002-3009.
Keaney J.F., Larson M.G., Vasan R.S., Wilson P.W., Lipinska I., Corey D., Massaro J.M., Sutherland P., Vita J.A. and Benjamin E.J. (2003). "Obesity and systemic oxidative stress clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **23**(3): 434-439.
Kelly R.F., Lamont K.T., Somers S., Hacking D., Lacerda L., Thomas P., Opie L.H. and Lecour S. (2010). "Ethanolamine is a novel STAT-3 dependent cardioprotective agent." Basic Res Cardiol **105**(6): 763-770.
Kemi M., Keenan K.P., McCoy C., Hoe C.M., Soper K.A., Ballam G.C. and van Zwieten M.J. (2000). "The relative protective effects of moderate dietary restriction versus dietary modification on spontaneous cardiomyopathy in male Sprague-Dawley rats." Toxicol Pathol **28**(2): 285-296.
Kemnitz J.W., Roecker E.B., Weindruch R., Elson D.F., Baum S.T. and Bergman R.N. (1994). "Dietary restriction increases insulin sensitivity and lowers blood glucose in rhesus monkeys." Am J Physiol **266**(4 Pt 1): E540-547.
Kenchaiah S., Evans J.C., Levy D., Wilson P.W., Benjamin E.J., Larson M.G., Kannel W.B. and Vasan R.S. (2002). "Obesity and the risk of heart failure." New England Journal of Medicine **347**(5): 305-313.
Kennedy G. (1957). "The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat." Journal of Endocrinology **16**(1): 9-17.
Kenyon C. (2011). "The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing." Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences **366**(1561): 9-16.
Kim J.W., Zou Y., Yoon S., Lee J.H., Kim Y.K., Yu B.P. and Chung H.Y. (2004). "Vascular aging: molecular modulation of the prostanoid cascade by calorie restriction." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **59**(9): B876-885.
Kliewer K.L., Ke J.Y., Lee H.Y., Stout M.B., Cole R.M., Samuel V.T., Shulman G.I. and Belury M.A. (2015). "Short-term food restriction followed by controlled refeeding promotes gorging behavior, enhances fat deposition, and diminishes insulin sensitivity in mice." J Nutr Biochem **26**(7): 721-728.
Kondo M., Shibata R., Miura R., Shimano M., Kondo K., Li P., Ohashi T., Kihara S., Maeda N., Walsh K., Ouchi N. and Murohara T. (2009). "Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **284**(3): 1718-1724.
Kuh D. and Shlomo Y.B. (2004). A life course approach to chronic disease epidemiology, Oxford University Press.
Kunisada K., Negoro S., Tone E., Funamoto M., Osugi T., Yamada S., Okabe M., Kishimoto T. and Yamauchi-Takihara K. (2000). "Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces

not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 315-319.
Laganiere S. and Yu B.P. (1993). "Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction." Gerontology **39**(1): 7-18.
Laight D.W., Desai K.M., Gopaul N.K., Anggard E.E. and Carrier M.J. (1999). "F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E." Eur J Pharmacol **377**(1): 89-92.
Lakatta E.G. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging." Circulation **107**(3): 490-497.
Lakatta E.G. and Levy D. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease." Circulation **107**(1): 139-146.
Lakatta E.G. and Levy D. (2003). "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease." Circulation **107**(2): 346-354.
Lal S.B., Ramsey J.J., Monemdjou S., Weindruch R. and Harper M.E. (2001). "Effects of caloric restriction on skeletal muscle mitochondrial proton leak in aging rats." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **56**(3): B116-122.
Lambert A.J. and Merry B.J. (2004). "Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(1): R71-79.
Lambert A.J., Wang B., Yardley J., Edwards J. and Merry B.J. (2004). "The effect of aging and caloric restriction on mitochondrial protein density and oxygen consumption." Exp Gerontol **39**(3): 289-295.
Landmesser U., Dikalov S., Price S.R., McCann L., Fukai T., Holland S.M., Mitch W.E. and Harrison D.G. (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." J Clin Invest **111**(8): 1201-1209.
Lane M.A., Ball S.S., Ingram D.K., Cutler R.G., Engel J., Read V. and Roth G.S. (1995). "Diet restriction in rhesus monkeys lowers fasting and glucose-stimulated glucoregulatory end points." Am J Physiol **268**(5 Pt 1): E941-948.
Lass A., Sohal B.H., Weindruch R., Forster M.J. and Sohal R.S. (1998). "Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria." Free Radical Biology and Medicine **25**(9): 1089-1097.
Laughlin M.R., Taylor J., Chesnick A.S., DeGroot M. and Balaban R.S. (1993). "Pyruvate and lactate metabolism in the in vivo dog heart." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **264**(6): H2068-H2079.
Laughlin M.R., Taylor J.F., Chesnick A.S. and Balaban R.S. (1992). "Regulation of glycogen metabolism in canine myocardium: effects of insulin and epinephrine in vivo." Am J Physiol **262**(6 Pt 1): E875-883.
Lavie C.J., De Schutter A., Patel D.A., Romero-Corral A., Artham S.M. and Milani R.V. (2012). "Body composition and survival in stable coronary heart disease: impact of lean mass index and body fat in the "obesity paradox"." J Am Coll Cardiol **60**(15): 1374-1380.
Lavie C.J., McAuley P.A., Church T.S., Milani R.V. and Blair S.N. (2014). "Obesity and cardiovascular diseases: implications regarding fitness, fatness, and severity in the obesity paradox." J Am Coll Cardiol **63**(14): 1345-1354.
Lavie C.J., Milani R.V. and Ventura H.O. (2007). "Obesity, heart disease, and favorable prognosis--truth or paradox?" Am J Med **120**(10): 825-826.
Lecour S. (2009). "Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?" Journal of molecular and cellular cardiology **47**(1): 32-40.
Lee C.K., Allison D.B., Brand J., Weindruch R. and Prolla T.A. (2002). "Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14988-14993.

Lee C.K., Klopp R.G., Weindruch R. and Prolla T.A. (1999). "Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction." Science **285**(5432): 1390-1393.
Lee C.K., Weindruch R. and Prolla T.A. (2000). "Gene-expression profile of the ageing brain in mice." Nat Genet **25**(3): 294-297.
Lee S.W., Jo H.H., Kim M.R., You Y.O. and Kim J.H. (2012). "Association between metabolic syndrome and serum leptin levels in postmenopausal women." J Obstet Gynaecol **32**(1): 73-77.
Leite R.D., Kraemer-Aguiar L.G., Boa B.C., Cyrino F.Z., Nivoit P. and Bouskela E. (2012). "Muscle endothelial-dependent microvascular dysfunction in adulthood due to early postnatal overnutrition." Microvasc Res **84**(1): 94-98.
Lever A.F. and Harrap S.B. (1992). "Essential hypertension: a disorder of growth with origins in childhood?" Journal of hypertension **10**(2): 101-120.
Levy B., Mansart A., Montemont C., Gibot S., Mallie J.-P., Regnault V., Lecompte T. and Lacolley P. (2007). "Myocardial lactate deprivation is associated with decreased cardiovascular performance, decreased myocardial energetics, and early death in endotoxic shock." Intensive care medicine **33**(3): 495-502.
Li F., Wang X., Capasso J.M. and Gerdes A.M. (1996). "Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development." Journal of molecular and cellular cardiology **28**(8): 1737-1746.
Li G., Kohorst J.J., Zhang W., Laritsky E., Kunde-Ramamoorthy G., Baker M.S., Fiorotto M.L. and Waterland R.A. (2013). "Early postnatal nutrition determines adult physical activity and energy expenditure in female mice." Diabetes **62**(8): 2773-2783.
Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., Chan P.H., Wallace D.C. and Epstein C.J. (1995). "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." Nat Genet **11**(4): 376-381.
Li Y., Plagemann A. and Davidowa H. (2002). "Increased inhibition by agouti-related peptide of ventromedial hypothalamic neurons in rats overweight due to early postnatal overfeeding." Neurosci Lett **330**(1): 33-36.
Liu H.W., Mahmood S., Srinivasan M., Smiraglia D.J. and Patel M.S. (2013). "Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats." J Nutr Biochem **24**(11): 1859-1869.
Liu H.W., Srinivasan M., Mahmood S., Smiraglia D.J. and Patel M.S. (2013). "Adult-onset obesity induced by early life overnutrition could be reversed by moderate caloric restriction." Am J Physiol Endocrinol Metab **305**(7): E785-794.
Liu Z., Lim C.Y., Su M.Y., Soh S.L., Shui G., Wenk M.R., Grove K.L., Radda G.K., Han W. and Xiao X. (2013). "Neonatal overnutrition in mice exacerbates high-fat diet-induced metabolic perturbations." J Endocrinol **219**(2): 131-143.
Lobstein T., Rigby N. and Leach R. (2005). "International Obesity Task Force EU platform briefing paper." Obesity in Europe. EASO, editor.
Lopaschuk G.D. and Stanley W.C. (1997). "Glucose metabolism in the ischemic heart." Circulation **95**(2): 313-315.
Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D., Jaswal J.S. and Stanley W.C. (2010). "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease." Physiol Rev **90**(1): 207-258.
Lopez M., Seoane L.M., Tovar S., Garcia M.C., Nogueiras R., Dieguez C. and Senaris R.M. (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): 140-148.
Maeda H., Gleiser C.A., Masoro E.J., Murata I., McMahan C.A. and Yu B.P. (1985). "Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats: II. Pathology." J Gerontol **40**(6): 671-688.
Manasek F.J. (1968). "Mitosis in developing cardiac muscle." The Journal of cell biology **37**(1): 191-196.

Mandavia C.H., Pulakat L., DeMarco V. and Sowers J.R. (2012). "Over-nutrition and metabolic cardiomyopathy." Metabolism **61**(9): 1205-1210.
Marín-García J. and Goldenthal M.J. (2008). "Mitochondrial centrality in heart failure." Heart failure reviews **13**(2): 137-150.
Marsh J.B. (2003). "Lipoprotein metabolism in obesity and diabetes: insights from stable isotope kinetic studies in humans." Nutr Rev **61**(11): 363-375.
Martins M.R., Vieira A.K., de Souza E.P. and Moura A.S. (2008). "Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice." J Endocrinol **198**(3): 591-598.
Matsushima S., Ide T., Yamato M., Matsusaka H., Hattori F., Ikeuchi M., Kubota T., Sunagawa K., Hasegawa Y., Kurihara T., Oikawa S., Kinugawa S. and Tsutsui H. (2006). "Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice." Circulation **113**(14): 1779-1786.
Matsuzawa Y. (2006). "The metabolic syndrome and adipocytokines." FEBS Lett **580**(12): 2917-2921.
McCay C., Crowell M.F. and Maynard L. (1935). "The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size." J nutr **10**(1): 63-79.
McKelvey T., Hollwarth M., Granger D., Engerson T., Landler U. and Jones H. (1988). "Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney." American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology **254**(5): G753-G760.
McQueen A.P., Zhang D., Hu P., Swenson L., Yang Y., Zaha V.G., Hoffman J.L., Yun U.J., Chakrabarti G. and Wang Z. (2005). "Contractile dysfunction in hypertrophied hearts with deficient insulin receptor signaling: possible role of reduced capillary density." Journal of molecular and cellular cardiology **39**(6): 882-892.
Melanson K.J., McINNIS K.J., Rippe J.M., Blackburn G. and Wilson P.F. (2001). "Obesity and cardiovascular disease risk: research update." Cardiology in review **9**(4): 202-207.
Merry B.J. (2000). "Calorie restriction and age-related oxidative stress." Ann N Y Acad Sci **908**: 180-198.
Merry B.J. (2004). "Oxidative stress and mitochondrial function with aging--the effects of calorie restriction." Aging Cell **3**(1): 7-12.
Messerli F.H. (1986). "Cardiopathy of obesity—a not-so-Victorian disease." New England Journal of Medicine **314**(6): 378-380.
Meyer T.E., Kovács S.J., Ehsani A.A., Klein S., Holloszy J.O. and Fontana L. (2006). "Long-term caloric restriction ameliorates the decline in diastolic function in humans." Journal of the American College of Cardiology **47**(2): 398-402.
Michel M.C. and Rascher W. (1995). "Neuropeptide Y: a possible role in hypertension?" Journal of hypertension **13**(4): 385-396.
Modan M., Halkin H., Almog S., Lusky A., Eshkol A., Shefi M., Shitrit A. and Fuchs Z. (1985). "Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance." J Clin Invest **75**(3): 809-817.
Mokdad A.H., Ford E.S., Bowman B.A., Nelson D.E., Engelgau M.M., Vinicor F. and Marks J.S. (2000). "Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998." Diabetes Care **23**(9): 1278-1283.
Moreira A.S., Teixeira Teixeira M., da Silveira Osso F., Pereira R.O., de Oliveira Silva-Junior G., Garcia de Souza E.P., Mandarim de Lacerda C.A. and Moura A.S. (2009). "Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life." Nutr Metab Cardiovasc Dis **19**(11): 805-810.
MOREL Y. and BAROUKI R. (1999). "Repression of gene expression by oxidative stress." Biochemical Journal **342**(3): 481-496.
Moreno L.A., Pineda I., Rodriguez G., Fleta J., Giner A., Juste M.G., Sarria A. and Bueno M. (2002). "Leptin and metabolic syndrome in obese and non-obese children." Horm Metab Res **34**(7): 394-399.
Morisco C., Lembo G. and Trimarco B. (2006). "Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology." Trends in cardiovascular medicine **16**(6): 183-188.

Morrison J.L., Duffield J.A., Muhlhausler B.S., Gentili S. and McMillen I.C. (2010). "Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity." Pediatric nephrology **25**(4): 669-677.
Mozes S., Sefcikova Z. and Racek L. (2015). "Effect of repeated fasting/refeeding on obesity development and health complications in rats arising from reduced nest." Dig Dis Sci **60**(2): 354-361.
Must A., Jacques P.F., Dallal G.E., Bajema C.J. and Dietz W.H. (1992). "Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents: a follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935." New England journal of medicine **327**(19): 1350-1355.
Muzumdar R., Allison D.B., Huffman D.M., Ma X., Atzmon G., Einstein F.H., Fishman S., Poduval A.D., McVei T., Keith S.W. and Barzilai N. (2008). "Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity." Aging Cell **7**(3): 438-440.
Neves F.A., Cortez E., Bernardo A.F., Mattos A.B., Vieira A.K., Malafaia Tde O., Thole A.A., Rodrigues-Cunha A.C., Garcia-Souza E.P., Sichieri R. and Moura A.S. (2014). "Heart energy metabolism impairment in Western-diet induced obese mice." J Nutr Biochem **25**(1): 50-57.
Newnham J.P. and Ross M.G. (2009). Early life origins of human health and disease, Cambridge Univ Press.
Nisoli E., Tonello C., Cardile A., Cozzi V., Bracale R., Tedesco L., Falcone S., Valerio A., Cantoni O., Clementi E., Moncada S. and Carruba M.O. (2005). "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS." Science **310**(5746): 314-317.
Nojiri H., Shimizu T., Funakoshi M., Yamaguchi O., Zhou H., Kawakami S., Ohta Y., Sami M., Tachibana T., Ishikawa H., Kurosawa H., Kahn R.C., Otsu K. and Shirasawa T. (2006). "Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration." J Biol Chem **281**(44): 33789-33801.
Noyan H., El-Mounayri O., Isserlin R., Arab S., Momen A., Cheng H.S., Wu J., Afroze T., Li R.K., Fish J.E., Bader G.D. and Husain M. (2015). "Cardioprotective Signature of Short-Term Caloric Restriction." PLoS One **10**(6): e0130658.
Ohashi K., Kihara S., Ouchi N., Kumada M., Fujita K., Hiuge A., Hibuse T., Ryo M., Nishizawa H., Maeda N., Maeda K., Shibata R., Walsh K., Funahashi T. and Shimomura I. (2006). "Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension." Hypertension **47**(6): 1108-1116.
Oken E., Taveras E.M., Kleinman K.P., Rich-Edwards J.W. and Gillman M.W. (2007). "Gestational weight gain and child adiposity at age 3 years." Am J Obstet Gynecol **196**(4): 322.e321-328.
Olivetti G., Cigola E., Maestri R., Corradi D., Lagrasta C., Gambert S.R. and Anversa P. (1996). "Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart." Journal of molecular and cellular cardiology **28**(7): 1463-1477.
Ong K.K., Ahmed M.L., Emmett P.M., Preece M.A. and Dunger D.B. (2000). "Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study." Bmj **320**(7240): 967-971.
Oparil S., Bishop S. and Clubb F. (1984). "Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia." Hypertension **6**(6 Pt 2): III38.
Opie L.H. (1969). "Metabolism of the heart in health and disease. Part II." American heart journal **77**(1): 100-122.
Opie L.H. (1975). "Metabolism of free fatty acids, glucose and catecholamines in acute myocardial infarction: relation to myocardial ischemia and infarct size." The American journal of cardiology **36**(7): 938-953.
Oreopoulos A., Padwal R., Kalantar-Zadeh K., Fonarow G.C., Norris C.M. and McAlister F.A. (2008). "Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis." Am Heart J **156**(1): 13-22.
Otero M., Lago R., Lago F., Casanueva F.F., Dieguez C., Gomez-Reino J.J. and Gualillo O. (2005). "Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights." FEBS Lett **579**(2): 295-301.

Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Maeda K., Kuriyama H., Okamoto Y., Hotta K., Nishida M., Takahashi M., Nakamura T., Yamashita S., Funahashi T. and Matsuzawa Y. (1999). "Novel modulator for endothelial adhesion molecules - Adipocyte-derived plasma protein adiponectin." Circulation **100**(25): 2473-2476.
Oudot A., Martin C., Busseuil D., Vergely C., Demaison L. and Rochette L. (2006). "NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging." Free Radical Biology and Medicine **40**(12): 2214-2222.
Owen C.G., Martin R.M., Whincup P.H., Smith G.D. and Cook D.G. (2006). "Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence." The American journal of clinical nutrition **84**(5): 1043-1054.
Pamplona R., Portero-Otın M., Ruiz C., Gredilla R., Herrero A. and Barja G. (2000). "Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals." Mechanisms of ageing and development **112**(3): 169-183.
Park H.Y., Kwon H.M., Lim H.J., Hong B.K., Lee J.Y., Park B.E., Jang Y., Cho S.Y. and Kim H.S. (2001). "Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro." Exp Mol Med **33**(2): 95-102.
Park M., Falconer C., Viner R. and Kinra S. (2012). "The impact of childhood obesity on morbidity and mortality in adulthood: a systematic review." Obesity Reviews **13**(11): 985-1000.
Pecqueur C., Alves-Guerra M.C., Gelly C., Levi-Meyrueis C., Couplan E., Collins S., Ricquier D., Bouillaud F. and Miroux B. (2001). "Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation." J Biol Chem **276**(12): 8705-8712.
Pelkman C.L., Fishell V.K., Maddox D.H., Pearson T.A., Mauger D.T. and Kris-Etherton P.M. (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): 204-212.
Perego L., Pizzocri P., Corradi D., Maisano F., Paganelli M., Fiorina P., Barbieri M., Morabito A., Paolisso G., Folli F. and Pontiroli A.E. (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): 4087-4093.
Pereira R.O., Moreira A.S., de Carvalho L. and Moura A.S. (2006). "Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts." Regul Pept **136**(1-3): 117-121.
Pettitt D.J., Bennett P.H., Knowler W.C., Baird H.R. and Aleck K.A. (1985). "Gestational diabetes mellitus and impaired glucose tolerance during pregnancy: long-term effects on obesity and glucose tolerance in the offspring." Diabetes **34**(Supplement 2): 119-122.
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." American journal of obstetrics and gynecology **140**(7): 730-736.
Pierce G.L., Beske S.D., Lawson B.R., Southall K.L., Benay F.J., Donato A.J. and Seals D.R. (2008). "Weight loss alone improves conduit and resistance artery endothelial function in young and older overweight/obese adults." Hypertension **52**(1): 72-79.
Plagemann A. (2006). "Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake." Horm Res **65 Suppl 3**: 83-89.
Plagemann A., Harder T., Brunn M., Harder A., Roepke K., Wittrock-Staar M., Ziska T., Schellong K., Rodekamp E., Melchior K. and Dudenhausen J.W. (2009). "Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome." J Physiol **587**(Pt 20): 4963-4976.
Plagemann A., Harder T., Rake A., Melchior K., Rohde W. and Dorner G. (1999). "Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats." Brain Res **818**(1): 160-163.

Plagemann A., Harder T., Rake A., Voits M., Fink H., Rohde W. and Dorner G. (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): 146-155.
Plagemann A., Harder T., Rake A., Waas T., Melchior K., Ziska T., Rohde W. and Dorner G. (1999). "Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats." J Neuroendocrinol **11**(7): 541-546.
Plagemann A., Harder T., Schellong K., Schulz S. and Stupin J.H. (2012). "Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **26**(5): 641-653.
Plagemann A., Heidrich I., Gotz F., Rohde W. and Dorner G. (1992). "Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding." Exp Clin Endocrinol **99**(3): 154-158.
Plagemann A., Roepke K., Harder T., Brunn M., Harder A., Wittrock-Staar M., Ziska T., Schellong K., Rodekamp E., Melchior K. and Dudenhausen J.W. (2010). "Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding." J Perinat Med **38**(4): 393-400.
Portella A.K., Silveira P.P., Laureano D.P., Cardoso S., Bittencourt V., Noschang C., Werlang I., Fontella F.U., Dalmaz C. and Goldani M.Z. (2015). "Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats." Behav Brain Res **278**: 66-73.
Pou K.M., Massaro J.M., Hoffmann U., Vasan R.S., Maurovich-Horvat P., Larson M.G., Keaney J.F., Jr., Meigs J.B., Lipinska I., Kathiresan S., Murabito J.M., O'Donnell C.J., Benjamin E.J. and Fox C.S. (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): 1234-1241.
Puente B.N., Kimura W., Muralidhar S.A., Moon J., Amatruda J.F., Phelps K.L., Grinsfelder D., Rothermel B.A., Chen R., Garcia J.A., Santos C.X., Thet S., Mori E., Kinter M.T., Rindler P.M., Zacchigna S., Mukherjee S., Chen D.J., Mahmoud A.I., Giacca M., Rabinovitch P.S., Aroumougame A., Shah A.M., Szweda L.I. and Sadek H.A. (2014). "The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response." Cell **157**(3): 565-579.
Purdham D.M., Zou M.X., Rajapurohitam V. and Karmazyn M. (2004). "Rat heart is a site of leptin production and action." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(6): H2877-2884.
Qiao L., Lee B., Kinney B., Yoo H.S. and Shao J. (2011). "Energy intake and adiponectin gene expression." Am J Physiol Endocrinol Metab **300**(5): E809-816.
Raitakari M., Ilvonen T., Ahotupa M., Lehtimäki T., Harmoinen A., Suominen P., Elo J., Hartiala J. and Raitakari O.T. (2004). "Weight reduction with very-low-caloric diet and endothelial function in overweight adults: role of plasma glucose." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **24**(1): 124-128.
Rajapurohitam V., Gan X.T., Kirshenbaum L.A. and Karmazyn M. (2003). "The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes." Circ Res **93**(4): 277-279.
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): 905-914.
Reaven G.M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes **37**(12): 1595-1607.
Reaven G.M. (2006). "The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary?" Am J Clin Nutr **83**(6): 1237-1247.
Rider O.J., Petersen S.E., Francis J.M., Ali M.K., Hudsmith L.E., Robinson M.R., Clarke K. and Neubauer S. (2010). "Ventricular hypertrophy and cavity dilatation in relation to body mass index in females with uncomplicated obesity." Heart: hrt. 2009.185009.
Rivello H.G., Meckert P.C., Gallo A., Palacios L. and Laguens R.P. (2002). "DNA content and expression of cell cycle proteins in caterpillar nuclei from fetal human cardiac myocytes." Virchows Archiv **440**(1): 45-49.

Rochette L., Lorin J., Zeller M., Guilland J.C., Lorgis L., Cottin Y. and Vergely C. (2013). "Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?" Pharmacol Ther **140**(3): 239-257.
Rochette L., Zeller M., Cottin Y. and Vergely C. (2014). "Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies." Biochim Biophys Acta **1840**(9): 2709-2729.
Rodrigues A.L., de Moura E.G., Passos M.C., Trevenzoli I.H., da Conceicao E.P., Bonono I.T., Neto J.F. and Lisboa P.C. (2011). "Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats." J Nutr Biochem **22**(2): 109-117.
Rodrigues A.L., De Souza E.P., Da Silva S.V., Rodrigues D.S., Nascimento A.B., Barja-Fidalgo C. and De Freitas M.S. (2007). "Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition." J Endocrinol **195**(3): 485-494.
Rohrbach S., Aslam M., Niemann B. and Schulz R. (2014). "Impact of caloric restriction on myocardial ischaemia/reperfusion injury and new therapeutic options to mimic its effects." Br J Pharmacol **171**(12): 2964-2992.
Romero-Corral A., Montori V.M., Somers V.K., Korinek J., Thomas R.J., Allison T.G., Mookadam F. and Lopez-Jimenez F. (2006). "Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies." The Lancet **368**(9536): 666-678.
Rosca M.G. and Hoppel C.L. (2013). "Mitochondrial dysfunction in heart failure." Heart failure reviews **18**(5): 607-622.
Rosen E.D. and Spiegelman B.M. (2006). "Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." Nature **444**(7121): 847-853.
Santalucia T., Camps M., Castello A., Munoz P., Nuel A., Testar X., Palacin M. and Zorzano A. (1992). "Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue." Endocrinology **130**(2): 837-846.
Sasaki S., Higashi Y., Nakagawa K., Kimura M., Noma K., Sasaki S., Hara K., Matsuura H., Goto C. and Oshima T. (2002). "A low-calorie diet improves endothelium-dependent vasodilation in obese patients with essential hypertension*." American journal of hypertension **15**(4): 302-309.
Schaper J., Meiser E. and Stämmler G. (1985). "Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts." Circulation research **56**(3): 377-391.
Schmidt I., Fritz A., Scholch C., Schneider D., Simon E. and Plagemann A. (2001). "The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats." Int J Obes Relat Metab Disord **25**(8): 1168-1174.
Schulze P.C., Kratzsch J., Linke A., Schoene N., Adams V., Gielen S., Erbs S., Moebius-Winkler S. and Schuler G. (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.
Sefcikova Z., Bujnakova D., Racek L., Kmet V. and Mozes S. (2011). "Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests." Physiol Res **60**(2): 337-346.
Sefcikova Z. and Racek L. (2015). "Effect of neonatal beta3-adrenoceptor agonist CL 316,243 treatment on body fat accumulation and intestinal alkaline phosphatase activity in rats from reduced nests." Folia Histochem Cytobiol **53**(4): 307-313.
Selman C., Lingard S., Choudhury A.I., Batterham R.L., Claret M., Clements M., Ramadani F., Okkenhaug K., Schuster E., Blanc E., Piper M.D., Al-Qassab H., Speakman J.R., Carmignac D., Robinson I.C.A., Thornton J.M., Gems D., Partridge L. and Withers D.J. (2008). "Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice." Faseb Journal **22**(3): 807-818.
Selman C., Partridge L. and Withers D.J. (2011). "Replication of extended lifespan phenotype in mice with deletion of insulin receptor substrate 1." PLoS One **6**(1): e16144.

Sena S., Hu P., Zhang D., Wang X., Wayment B., Olsen C., Avelar E., Abel E.D. and Litwin S.E. (2009). "Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction." Journal of molecular and cellular cardiology **46**(6): 910-918.
Severs N.J. (2000). "The cardiac muscle cell." Bioessays **22**(2): 188-199.
Seymour E.M., Parikh R.V., Singer A.A. and Bolling S.F. (2006). "Moderate calorie restriction improves cardiac remodeling and diastolic dysfunction in the Dahl-SS rat." J Mol Cell Cardiol **41**(4): 661-668.
Shibata R., Ouchi N., Ito M., Kihara S., Shiojima I., Pimentel D.R., Kumada M., Sato K., Schiekofer S., Ohashi K., Funahashi T., Colucci W.S. and Walsh K. (2004). "Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart." Nat Med **10**(12): 1384-1389.
Shinmura K., Tamaki K. and Bolli R. (2005). "Short-term caloric restriction improves ischemic tolerance independent of opening of ATP-sensitive K+ channels in both young and aged hearts." Journal of molecular and cellular cardiology **39**(2): 285-296.
Shinmura K., Tamaki K. and Bolli R. (2008). "Impact of 6-mo caloric restriction on myocardial ischemic tolerance: possible involvement of nitric oxide-dependent increase in nuclear Sirt1." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **295**(6): H2348-H2355.
Shinmura K., Tamaki K., Saito K., Nakano Y., Tobe T. and Bolli R. (2007). "Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase." Circulation **116**(24): 2809-2817.
Shinmura K., Tamaki K., Sano M., Nakashima-Kamimura N., Wolf A.M., Amo T., Ohta S., Katsumata Y., Fukuda K., Ishiwata K., Suematsu M. and Adachi T. (2011). "Caloric restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating specific mitochondrial proteins of the electron transport chain." Circ Res **109**(4): 396-406.
Sicard P., Oudot A., Guilland J.C., Moreau D., Vergely C. and Rochette L. (2006). "Dissociation between vascular oxidative stress and cardiovascular function in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats." Vascul Pharmacol **45**(2): 112-121.
Silverman B.L., Metzger B.E., Cho N.H. and Loeb C.A. (1995). "Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers: relationship to fetal hyperinsulinism." Diabetes care **18**(5): 611-617.
Singhal A., Cole T.J., Fewtrell M., Kennedy K., Stephenson T., Elias-Jones A. and Lucas A. (2007). "Promotion of Faster Weight Gain in Infants Born Small for Gestational Age Is There an Adverse Effect on Later Blood Pressure?" Circulation **115**(2): 213-220.
Singhal A. and Lucas A. (2004). "Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis?" The Lancet **363**(9421): 1642-1645.
Slieker L.J., Sloop K.W., Surface P.L., Kriauciunas A., LaQuier F., Manetta J., Bue-Valleskey J. and Stephens T.W. (1996). "Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP." J Biol Chem **271**(10): 5301-5304.
Smith C.C. and Yellon D.M. (2011). "Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection." Pharmacology & therapeutics **129**(2): 206-219.
Sohal R.S., Ku H.H., Agarwal S., Forster M.J. and Lal H. (1994). "Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse." Mech Ageing Dev **74**(1-2): 121-133.
Sohal R.S. and Weindruch R. (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." Science **273**(5271): 59-63.
Soonpaa M. and Field L.J. (1997). "Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **272**(1): H220-H226.
Sorof J. and Daniels S. (2002). "Obesity hypertension in children a problem of epidemic proportions." Hypertension **40**(4): 441-447.

Spaulding C.C., Walford R.L. and Effros R.B. (1997). "Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice." Mech Ageing Dev **93**(1-3): 87-94.
Speakman J.R. (2005). "Body size, energy metabolism and lifespan." Journal of Experimental Biology **208**(9): 1717-1730.
Speakman J.R. and Mitchell S.E. (2011). "Caloric restriction." Mol Aspects Med **32**(3): 159-221.
Spiegelman B.M. and Flier J.S. (2001). "Obesity and the regulation of energy balance." Cell **104**(4): 531-543.
Srinivasan M., Mahmood S. and Patel M.S. (2013). "Metabolic programming effects initiated in the suckling period predisposing for adult-onset obesity cannot be reversed by calorie restriction." Am J Physiol Endocrinol Metab **304**(5): E486-494.
Strom A. and Jensen R.A. (1951). "Mortality from circulatory diseases in Norway 1940-1945." Lancet **1**(6647): 126-129.
Sung M.M., Soltys C.L., Masson G., Boisvenue J.J. and Dyck J.R. (2011). "Improved cardiac metabolism and activation of the RISK pathway contributes to improved post-ischemic recovery in calorie restricted mice." J Mol Med (Berl) **89**(3): 291-302.
Sverdlov A.L., Elezaby A., Behring J.B., Bachschmid M.M., Luptak I., Tu V.H., Siwik D.A., Miller E.J., Liesa M., Shirihai O.S., Pimentel D.R., Cohen R.A. and Colucci W.S. (2015). "High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II." J Mol Cell Cardiol **78**: 165-173.
Sverdlov A.L., Elezaby A., Qin F., Behring J.B., Luptak I., Calamaras T.D., Siwik D.A., Miller E.J., Liesa M., Shirihai O.S., Pimentel D.R., Cohen R.A., Bachschmid M.M. and Colucci W.S. (2016). "Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Cardiac Structural, Functional, and Mitochondrial Consequences of Diet-Induced Metabolic Heart Disease." J Am Heart Assoc **5**(1).
Taffet G.E., Pham T.T. and Hartley C.J. (1997). "The age-associated alterations in late diastolic function in mice are improved by caloric restriction." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **52**(6): B285-290.
Takatsu M., Nakashima C., Takahashi K., Murase T., Hattori T., Ito H., Murohara T. and Nagata K. (2013). "Calorie restriction attenuates cardiac remodeling and diastolic dysfunction in a rat model of metabolic syndrome." Hypertension **62**(5): 957-965.
Thogersen A.M., Soderberg S., Jansson J.H., Dahlen G., Boman K., Nilsson T.K., Lindahl B., Weinehall L., Stenlund H., Lundberg V., Johnson O., Ahren B. and Hallmans G. (2004). "Interactions between fibrinolysis, lipoproteins and leptin related to a first myocardial infarction." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **11**(1): 33-40.
Thomas M., Gavrila D., McCormick M.L., Miller F.J., Jr., Daugherty A., Cassis L.A., Dellsperger K.C. and Weintraub N.L. (2006). "Deletion of p47phox attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **114**(5): 404-413.
Tilg H. and Kaser A. (2011). "Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction." J Clin Invest **121**(6): 2126-2132.
Timpson N.J., Harbord R., Smith G.D., Zacho J., Tybjærg-Hansen A. and Nordestgaard B.G. (2009). "Does greater adiposity increase blood pressure and hypertension risk? Mendelian randomization using the FTO/MC4R genotype." Hypertension **54**(1): 84-90.
Tocchi A., Quarles E.K., Basisty N., Gitari L. and Rabinovitch P.S. (2015). "Mitochondrial dysfunction in cardiac aging." Biochim Biophys Acta **1847**(11): 1424-1433.
Trayhurn P. and Beattie J.H. (2001). "Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ." Proceedings of the Nutrition Society **60**(03): 329-339.
Tsutsui H., Kinugawa S. and Matsushima S. (2009). "Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling." Cardiovascular research **81**(3): 449-456.

Turdi S., Ge W., Hu N., Bradley K.M., Wang X. and Ren J. (2013). "Interaction between maternal and postnatal high fat diet leads to a greater risk of myocardial dysfunction in offspring via enhanced lipotoxicity, IRS-1 serine phosphorylation and mitochondrial defects." J Mol Cell Cardiol **55**: 117-129.
Umemura S., Nyui N., Tamura K., Hibi K., Yamaguchi S., Nakamaru M., Ishigami T., Yabana M., Kihara M., Inoue S. and Ishii M. (1997). "Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients." Am J Hypertens **10**(6): 629-633.
Ungvari Z., Buffenstein R., Austad S.N., Podlutsky A., Kaley G. and Csiszar A. (2008). "Oxidative stress in vascular senescence: lessons from successfully aging species." Front Biosci **13**: 5056-5070.
Uretsky S., Messerli F.H., Bangalore S., Champion A., Cooper-DeHoff R.M., Zhou Q. and Pepine C.J. (2007). "Obesity paradox in patients with hypertension and coronary artery disease." The American journal of medicine **120**(10): 863-870.
Varady K.A., Roohk D.J., Loe Y.C., McEvoy-Hein B.K. and Hellerstein M.K. (2007). "Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice." J Lipid Res **48**(10): 2212-2219.
Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Martasek P., Hogg N., Masters B.S., Karoui H., Tordo P. and Pritchard K.A., Jr. (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9220-9225.
Velkoska E., Cole T.J., Dean R.G., Burrell L.M. and Morris M.J. (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): 1622-1627.
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): E1236-1243.
Ventura-Clapier R., Garnier A., Veksler V. and Joubert F. (2011). "Bioenergetics of the failing heart." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1813**(7): 1360-1372.
Vergely C., Maupoil V., Benderitter M. and Rochette L. (1998). "Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on postischemic recovery during reperfusion." Free Radic Biol Med **24**(3): 470-479.
Vergely C., Tabard A., Maupoil V. and Rochette L. (2001). "Isolated perfused rat hearts release secondary free radicals during ischemia reperfusion injury: cardiovascular effects of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butylnitrone." Free Radic Res **35**(5): 475-489.
Vessieres E., Dib A., Bourreau J., Lelievre E., Custaud M.A., Lelievre-Pegorier M., Loufrani L., Henrion D. and Fassot C. (2016). "Long Lasting Microvascular Tone Alteration in Rat Offspring Exposed In Utero to Maternal Hyperglycaemia." PLoS One **11**(1): e0146830.
Vickers M. and Sloboda D. (2012). "Leptin as mediator of the effects of developmental programming." Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism **26**(5): 677-687.
Vickers M.H., Krechowec S.O. and Breier B.H. (2007). "Is later obesity programmed in utero?" Curr Drug Targets **8**(8): 923-934.
Vieira A.K., Soares V.M., Bernardo A.F., Neves F.A., Mattos A.B., Guedes R.M., Cortez E., Andrade D.C., Lacerda-Miranda G., Garcia-Souza E.P. and Moura A.S. (2015). "Overnourishment during lactation induces metabolic and haemodynamic heart impairment during adulthood." Nutr Metab Cardiovasc Dis **25**(11): 1062-1069.
Vincent H.K., Powers S.K., Stewart D.J., Shanely R.A., Demirel H. and Naito H. (1999). "Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress." International Journal of Obesity **23**(1): 67-74.
Von Kries R., Koletzko B., Sauerwald T., Von Mutius E., Barnert D., Grunert V. and Von Voss H. (1999). "Breast feeding and obesity: cross sectional study." Bmj **319**(7203): 147-150.

Vozarova de Courten B., de Courten M., Hanson R.L., Zahorakova A., Egyenes H.P., Tataranni P.A., Bennett P.H. and Vozar J. (2003). "Higher prevalence of type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular diseases in gypsies than in non-gypsies in Slovakia." Diabetes Res Clin Pract **62**(2): 95-103.
Walford R.L., Harris S.B. and Gunion M.W. (1992). "The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(23): 11533-11537.
Wan R., Ahmet I., Brown M., Cheng A., Kamimura N., Talan M. and Mattson M.P. (2010). "Cardioprotective effect of intermittent fasting is associated with an elevation of adiponectin levels in rats." J Nutr Biochem **21**(5): 413-417.
Wang T.J., Parise H., Levy D., D'Agostino R.B., Wolf P.A., Vasan R.S. and Benjamin E.J. (2004). "Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation." Jama **292**(20): 2471-2477.
Wang Z.V. and Scherer P.E. (2008). "Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension." Hypertension **51**(1): 8-14.
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): 357-364.
Wiedmer P., Klaus S. and Ortmann S. (2002). "Energy metabolism of young rats after early postnatal overnutrition." Br J Nutr **88**(3): 301-306.
Willcox D.C., Willcox B.J., Todoriki H., Curb J.D. and Suzuki M. (2006). "Caloric restriction and human longevity: what can we learn from the Okinawans?" Biogerontology **7**(3): 173-177.
Wilsey J. and Scarpace P.J. (2004). "Caloric restriction reverses the deficits in leptin receptor protein and leptin signaling capacity associated with diet-induced obesity: role of leptin in the regulation of hypothalamic long-form leptin receptor expression." J Endocrinol **181**(2): 297-306.
Witteles R.M. and Fowler M.B. (2008). "Insulin-resistant cardiomyopathy: clinical evidence, mechanisms, and treatment options." Journal of the American College of Cardiology **51**(2): 93-102.
Wolin M.S. (1996). "Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms." Microcirculation **3**(1): 1-17.
Wong C. and Marwick T.H. (2007). "Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology." Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine **4**(8): 436-443.
Wong C.Y., O'Moore-Sullivan T., Leano R., Byrne N., Beller E. and Marwick T.H. (2004). "Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity." Circulation **110**(19): 3081-3087.
Xiao X.Q., Williams S.M., Grayson B.E., Glavas M.M., Cowley M.A., Smith M.S. and Grove K.L. (2007). "Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis." Endocrinology **148**(9): 4150-4159.
Xu F.P., Chen M.S., Wang Y.Z., Yi Q., Lin S.B., Chen A.F. and Luo J.D. (2004). "Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes." Circulation **110**(10): 1269-1275.
Xu J., Xie Z., Reece R., Pimental D. and Zou M.H. (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): 2688-2695.
Yang R. and Barouch L.A. (2007). "Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences." Circ Res **101**(6): 545-559.
Yasue S., Masuzaki H., Okada S., Ishii T., Kozuka C., Tanaka T., Fujikura J., Ebihara K., Hosoda K., Katsurada A., Ohashi N., Urushihara M., Kobori H., Morimoto N., Kawazoe T., Naitoh M., Okada M., Sakaue H., Suzuki S. and Nakao K. (2010). "Adipose tissue-specific regulation of angiotensinogen in obese humans and mice: impact of nutritional status and adipocyte hypertrophy." Am J Hypertens **23**(4): 425-431.
Ye Z., Huang Y., Liu D., Chen X., Wang D., Huang D., Zhao L. and Xiao X. (2012). "Obesity induced by neonatal overfeeding worsens airway hyperresponsiveness and inflammation." PLoS One **7**(10): e47013.

Yim H.E., Ha K.S., Bae I.S., Yoo K.H., Hong Y.S. and Lee J.W. (2012). "Postnatal early overnutrition dysregulates the intrarenal renin-angiotensin system and extracellular matrix-linked molecules in juvenile male rats." J Nutr Biochem **23**(8): 937-945.
Yoshinaga M., Sameshima K., Tanaka Y., Wada A., Hashiguchi J., Tahara H. and Kono Y. (2008). "Adipokines and the prediction of the accumulation of cardiovascular risk factors or the presence of metabolic syndrome in elementary school children." Circulation Journal **72**(11): 1874-1878.
Yu B.P. (1996). "Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction." Free Radic Biol Med **21**(5): 651-668.
Zhu M., Miura J., Lu L.X., Bernier M., DeCabo R., Lane M.A., Roth G.S. and Ingram D.K. (2004). "Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization." Exp Gerontol **39**(7): 1049-1059.

VII. Annexes

Liste des communications

Communications orales:

1 Congrès nationaux

LI N, Guenancia C, Hachet O, Rigal E, Rochette L, Vergely C. Alterations of cardiac function induced by postnatal overfeeding in mice can be reversed by moderate diet restriction. Printemps de la Cardiologie, 2015 Toulouse

LI N, Guenancia C, Habbout A, Rigal E, Rochette L, Vergely C.. Postnatal overfeeding in mice increase susceptibility to cardiotoxicity and oxidative stress induced by doxorubicin. Printemps de la Cardiologie, 2013, Marseille

Guenancia C, **LI N**, Habbout A, Cottin Y, Dutratre P, Garrido C, Rochette L, Vergely C. Iron overload dose not potentiate doxorubicin induced cardiotoxicity in vivo in mice and in vitro in cardiomyocytes cell cultures. Printemps de la Cardiologie, 2014 Strasbourg

2 Congrès internationaux

LI N, Guenancia C, Baverel N, Rochette L, Vergely C. Alterations of cardiac function induced by postnatal overfeeding in mice can be reversed by moderate diet restriction". ICAN Conference Series: CardioMetabolic Diseases, 2013 Paris.

Communications affichées:

1 Congrès nationaux

LI N, Guenancia C, Rigal E, Hachet O, Chollet P, Leloup C, Rochette L, Vergely C. Oxidative stress and cardio-metabolic alterations induced by postnatal programming can be reversed in adulthood by a short-term moderate caloric restriction". Printemps de la Cardiologie, 2016 Dijon

LI N, Guenancia C, Rigal E, Rochette L, Vergely C. Alterations of cardiac function induced by postnatal overfeeding in mice can be reversed by moderate diet restriction. Printemps de la Cardiologie, 2014 Strasbourg.

LI N, Guenancia C, Rigal E, Rochette L, Vergely C. Alterations of cardiac function induced by postnatal overfeeding in mice can be reversed by moderate diet restriction". Séminaire FJC 23-24 Juin 2014, Besançon.

LI N, Guenancia C, Habbout A, Rigal E, Rochette L, Vergely C.La suralimentation postnatale chez la souris augmente la susceptibilité vis-à-vis de la cardiotoxicité et du stress oxydant induits par la doxorubicine"; séminaire FJC 25-26 Juin 2013, Dijon.

Guenancia C, **LI N**, Habbout A, Cottin Y, Dutratre P, Garrido C, Rochette L, Vergely C. Iron overload dose not potentiate doxorubicin induced cardiotoxicity in mice. Printemps de la Cardiologie, 2013, Marseille

Guenancia C, Hachet O, Aboutabl M, **LI N**, Rigal E, Cottin Y, Rochette L, Vergely C. Impact of overweight on anthracycline and trastuzumab-induced cardiotoxicity in mice. CPBI 2015, Strasbourg.

2 Congrès internationaux

LI N, Guenancia C, Rigal E, Rochette L, Vergely C. Moderate diet restriction can reverse alterations of cardiac function induced by postnatal overfeeding in mice". ESC 2014 Barcelona.

Guenancia C, **LI N**, Habbout A, Cottin Y, Dutratre P, Garrido C, Rochette L, Vergely C. Paradoxically, iron overload dose not potentiate doxorubicin induced cardiotoxicity in vivo in mice and in vitro in cardiomyocytes. ESC 2013 Amsterdam

Liste des publications

1) Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice. Soumis à "*Scientific Reports*"et en revision majeure
   Li N,Guenancia C, Rigal E, Hachet O, Chollet P, Desmoulins L, Leloup C, Rochette L, Vergely C. (tiré à part en annexe)

2) Overweight in mice, induced by perinatal programming, exacerbates doxorubicin and trastuzumab cardiotoxicity. Cancer Chemother Pharmacol. 2016 Apr;77(4):777-85. doi: 10.1007/s00280-016-2995-9. Epub 2016 Feb 25.
   Guenancia C, Hachet O, Aboutabl M, Li N, Rigal E, Cottin Y, Rochette L, Vergely C. (tiré à part en annexe)

3) Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. J Nutr. 2013 May;143(5):553-62. doi: 10.3945/jn.112.172825. Epub 2013 Feb 27. Review.
   Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. (tiré à part en annexe)

4) Paradoxically, iron overload does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro in cardiomyocytes and in vivo in mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2015 Apr 15;284(2):152-62. doi: 10.1016/j.taap.2015.02.015. Epub 2015 Feb 21.
   Guenancia C, Li N, Hachet O, Rigal E, Cottin Y, Dutartre P, Rochette L, Vergely C.

5) Toll-like receptor 5 deficiency exacerbates cardiac injury and inflammation induced by myocardial ischaemia-reperfusion in the mouse. Clin Sci (Lond). 2015 Jul;129(2):187-98. doi: 10.1042/CS20140444.
   Parapanov R, Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Feihl F, Waeber B, Milano G, Vergely C, Li N, Pacher P, Liaudet L.

6) Unprovoked atrial tachyarrhythmias in aging spontaneously hypertensive rats: the role of the autonomic nervous system. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012 Aug 1;303(3):H386-92. doi: 10.1152/ajpheart.00004.2012. Epub 2012 Jun 1.
   Scridon A1, Gallet C, Arisha MM, Oréa V, Chapuis B, Li N, Tabib A, Christé G, Barrès C, Julien C, Chevalier P.