



HAL
open science

Influence de l'environnement nutritionnel précoce sur la prolifération des cardiomyocytes et sur le risque d'insuffisance cardiaque post-infarctus

Marie Josse

► **To cite this version:**

Marie Josse. Influence de l'environnement nutritionnel précoce sur la prolifération des cardiomyocytes et sur le risque d'insuffisance cardiaque post-infarctus. Physiologie [q-bio.TO]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCI019 . tel-04553042

HAL Id: tel-04553042

<https://theses.hal.science/tel-04553042>

Submitted on 19 Apr 2024

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.



THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE AU LABORATOIRE DE PHYSIOPATHOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE

CEREBRO-CARDIOVASCULAIRES

Ecole doctorale n°554

Ecole Doctorale Environnement-Santé

Doctorat de Physiopathologie Cardiovasculaire

Par

Marie JOSSE

**INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT NUTRITIONNEL PRÉCOCE SUR LA
PROLIFÉRATION DES CARDIOMYOCYTES ET SUR LE RISQUE
D'INSUFFISANCE CARDIAQUE POST-INFARCTUS**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 20 décembre 2023

Composition du Jury :

Dr. Claire ARNAUD	Université Grenoble Alpes	Rapporteuse / Présidente
Dr. Mathias MERICKSKAY	Université Paris-Saclay	Rapporteur
Dr. Francesca ROCHAS	Centre de Génétique Médicale de Marseille	Examinatrice
Dr. Nathalie ROSENBLATT-VELIN	Université de Lausanne	Examinatrice
Pr. Catherine VERGELY	Université de Bourgogne	Directrice
Pr. Marianne ZELLER	Université de Bourgogne	Co-Directrice

Remerciements

En premier lieu, je remercie chaleureusement le professeure Catherine VERGELY pour m'avoir donné l'opportunité de mener à bien ce projet de recherche. Un immense merci pour ton accompagnement, tes précieux conseils qui m'ont permis de grandir et de m'épanouir professionnellement au cours de ces quatre années de doctorat. Merci d'avoir su créer de si belles opportunités de collaboration qui m'ont beaucoup appris. Merci pour ton soutien moral et ton aide qui m'ont aidé lors des moments les plus difficiles et merci pour tous ces bons moments passés ensemble au laboratoire ou ailleurs.

Je remercie le professeure Marianne ZELLER d'avoir co-dirigé cette Thèse et d'avoir pris le temps de lire et corriger ce manuscrit malgré les délais restreints.

Je remercie la directrice de recherche Claire ARNAUD d'avoir accepté d'être rapportrice de ce travail et de prendre le temps de lire ce manuscrit.

Je remercie le directeur de recherche Mathias MERICKSKAY d'avoir également accepté d'évaluer ce travail de recherche en tant que rapporteur.

Je remercie le professeure Corinne LELOUP d'avoir accepté de faire partie de ce jury de Thèse et d'examiner ce travail.

Je remercie chaleureusement la maîtresse de conférences Nathalie ROSENBLATT, d'être examinatrice mais également collaboratrice de ce projet. Merci beaucoup de m'avoir si bien accueillie à plusieurs reprises dans ton laboratoire et de m'avoir formé à la PCR et l'isolement des cardiomyocytes. Merci également pour ton aide et tes conseils toujours pertinents et formateurs tout au long de ce doctorat.

Je remercie profondément la chargée de recherche Francesca ROCHAIS d'avoir accepté d'examiner cette Thèse et d'y avoir collaboré. Un grand merci pour ton accueil chaleureux dans ton laboratoire, de m'avoir formé à l'histologie et de m'avoir aidé dans l'avancée de ce projet prometteur.

Je remercie Monsieur ROCHETTE pour sa présence au laboratoire qui m'a toujours donné le sourire. Merci pour vos dessins, vos ingénieux traits d'esprits et nombreuses anecdotes. Merci pour ce chocolat, toujours présent dans le frigo, qui a accompagné chacune de mes pauses.

Je remercie également le professeure Delphine BAETZ pour avoir fait partie de mon comité de suivi de Thèse et de m'avoir aiguillé dans ce projet de recherche à travers des remarques et conseils pertinents.

Merci Eve d'avoir été à mes côtés tout au long de cette aventure pleine de rebondissements. Un immense merci de m'avoir formé sur toutes ces techniques de laboratoire, pour ton aide en toutes circonstances et pour ces innombrables chirurgies réalisées pour mon projet, c'est un réel plaisir de travailler avec toi au quotidien. Mais merci encore plus pour ton amitié, ton soutien moral (on se souviendra longtemps de cette période de rédaction), les canons, les pleins de rien et j'en passe.

Merci Geoffrey d'avoir été un si bon compagnon de bureau, pour notre rituel matinal café-cookie qui me manquera grandement, ton soutien et nos discussions sur tous les sujets possibles (et en grande partie animés japonais).

Un grand merci à tous les stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer au laboratoire. Merci Marion, Tom, Nikola et Marie d'avoir participé à mon projet, ça a été un vrai plaisir de travailler avec vous. Merci Anh et Sandy pour votre compagnie et votre aide de tous les jours au laboratoire.

Merci à toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce projet, les membres du centre de zootechnie et Valérie, pour avoir si bien pris soin de mes souris, la plateforme Cellimap et Audrey, pour l'aide apportée aux analyses histologiques et les membres du laboratoire CAPS, pour le prêt du matériel d'histologie et du microtome.

Un immense merci à ma famille, à papa et maman, à Claire et Gégé, Pierre et Florent, pour m'avoir accompagnée tout au long de cette Thèse tout en prétendant comprendre sur quoi je travaillais. Merci à Samuel d'avoir fait de moi tatie Marie, pour mon plus grand bonheur.

Merci aux meilleurs des amis qui m'entourent, les amigos (Alex, Nono, Antoine, Téo, Louis), les loulous gênants (Anna aka bb, Alexis), Imothep (Célia, Hélia, Perrine, Kévin, Ronan, Anaëlle, Noémie, Marion, Corentin) et Leïlou. Merci d'avoir ponctué ces années de Thèse de week-ends et de vacances, plus que salvateurs. Merci Hugo d'avoir toujours été là tout en étant si loin.

Merci Elioth d'avoir surgi dans ma vie et de m'avoir soutenue tout au long de cette course effrénée de fin de Thèse, 1012 fois merci.

Et enfin, un grand merci tout particulier aux merveilleuses rencontres dijonnaises que j'ai eu la chance de faire au cours de ces quatre années, Sofia, Rico et Caro et bien sur mes deux colocs de glumes, Vincent et Manon, mes petits soleils de tous les jours, qui ont été présents en toutes circonstances. Merci pour ces randonnées, ces Trini, Flan, Craft, et pour tous ces moments partagés ensemble.

Table des matières

Liste des Tableaux	3
Liste des Figures	4
Liste des Abréviations	6
INTRODUCTION GÉNÉRALE	9
I. Surpoids, obésité et conséquences cardio-métaboliques	10
A. Surpoids et obésité.....	10
B. Syndrome métabolique et pathologies cardiovasculaires	12
C. Obésité infantile	16
II. Programmation périnatale.....	17
A. Théorie de Barker	17
B. Concept des Origines Développementales de la Santé	18
C. Modèle de suralimentation postnatale	19
D. Conséquences cardio-métaboliques de la suralimentation postnatale	21
III. Développement cardiaque	49
A. Développement cardiaque foetal	49
B. Développement cardiaque postnatal.....	49
C. Facteurs régulateurs de prolifération des cardiomyocytes	51
D. Métabolisme cardiaque	54
IV. Insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde	58
A. L'infarctus du myocarde.....	58
B. Cicatrisation et remodelage cardiaque post-infarctus	59
C. L'insuffisance cardiaque	62
OBJECTIFS DE LA THÈSE	66
MATÉRIEL ET MÉTHODES	68
I. Modèle de suralimentation postnatale	69
II. Protocoles expérimentaux.....	69
A. Effet de la SA sur le développement de l'insuffisance cardiaque post-IDM.....	69
B. Effet de la SA sur la prolifération des cardiomyocytes	70
III. Procédures expérimentales	71
A. Ischémie cardiaque permanente <i>in vivo</i>	71
B. Analyse échocardiographique	71
IV. Mesures biochimiques	74

A.	Dosage de la troponine I cardiaque	74
B.	Analyse lipidomique	74
V.	Histologie	75
A.	Immunofluorescence	75
B.	Coloration au Rouge Sirius	76
C.	Analyse des images	76
VI.	Isolation des cardiomyocytes et RT-PCR en temps réel	76
A.	Isolement des cardiomyocytes.....	76
B.	Extraction des ARN totaux	77
C.	Transcription inverse.....	77
D.	Réaction de polymérisation en chaine quantitative en temps réel (qPCR)	77
E.	Analyse des résultats.....	78
VII.	Analyses Statistiques.....	78
	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	80
I.	Article 1	81
II.	Article 2	116
	DISCUSSION GÉNÉRALE	141
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	148
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	151
	ANNEXES	163
I.	Communications orales	164
II.	Communications affichées.....	164
III.	Liste des publications.....	164
IV.	Enseignements.....	165

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR	78
--	----

Liste des Tableaux Article 1

Table 1 : Primer's sequences	91
---	----

Table 2 : Evolution of systolic function parameters of NF-MI and PNOF-MI mice up to 6 months post-MI (Protocol 2; n = 5 and 6 respectively).....	101
---	-----

Table 3 : Evolution of diastolic function parameters of NF-MI and PNOF-MI mice up to 6 months post-MI (Protocol 2; n = 5 and 6 respectively).....	101
--	-----

Liste des Tableaux Article 2

Table 1 : Primer's sequences	124
---	-----

Liste des Figures

Figure 1 : Schématisation du modèle de suralimentation postnatale (SA) par réduction de la taille de la portée chez la souris et ses conséquences sur le poids corporel [59].	20
Figure 2 : Conséquences cardiaques et vasculaires de la programmation néonatale par suralimentation postnatale (SA) chez le rongeur [136].	30
Figure 3 : Régulateurs intra et extracellulaires de la prolifération des cardiomyocytes.....	54
Figure 4 : Schématisation du métabolisme énergétique dans le myocarde	56
Figure 5 : Schématisation d'une partie des facteurs impliqués dans le remodelage cardiaque suivant un infarctus du myocarde.....	61
Figure 6 : Protocole expérimental des souris adultes NA et SA.....	70
Figure 7 : Protocole expérimental des nouveau-nés NA et SA.....	70
Figure 8 : Visualisation du ventricule gauche en coupe parasternale grand axe en mode luminosité (B-mode).....	72
Figure 9 : (A) Enregistrement d'un Doppler pulsé permettant la mesure des ondes E et A représentatives de la fonction diastolique. (B) Enregistrement d'un Doppler tissulaire permettant la mesure des ondes e' et a' représentatives de la fonction diastolique.....	73

Liste des Figures Article 1

Figure 1 : Schematic view of the experimental protocols.	101
Figure 2 : (A) Body weight evolution of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice (Protocol 1). (B) Body weight evolution of NF-MI and PNOF-MI mice (Protocol 2).	101
Figure 3 : (A) Infarct size of NF-MI and PNOF-MI mice measured 2 months post-surgery on echograph Vevo 770 (Protocol 1). (B) Infarct size of NF-MI and PNOF-MI mice measured 2 months post-surgery on echograph Vevo 3100 (Protocol 2). (C) Regression plot of correlation between LVEF and IS of NF-MI and PNOF-MI measured 2 months post-MI and exclusion criteria (Protocol 1 and 2).	102
Figure 4 : (A) LVEF evolution of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice (Protocol 1). (B) LVEF evolution of NF-MI and PNOF-MI mice (Protocol 2). (C) LVESA evolution of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice (Protocol 1). (D) LVESA evolution of NF-MI and PNOF-MI mice (Protocol 2). (E) LVEDA evolution of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice (Protocol 1). (F) LVEDA evolution of NF-MI and PNOF-MI mice (Protocol 2).	102
Figure 5 : (A) Cardiac mass represented as left ventricular mass on tibia length ratio of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI at 2 months post-surgery (Protocol 1). (B) Cardiac mass represented as left ventricular mass on tibia length ratio of NF-MI and PNOF-MI mice at 6-months post-MI (Protocol 2). (C) Lung mass of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI at 2 months post-surgery (Protocol 1). (D) Lung mass of NF-MI and PNOF-MI at 6 months post-MI (Protocol 2). (E) Circulating cardiac troponin I assay of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham	

and PNOF-MI at 24 hours post-surgery. (F) Cardiac interstitial fibrosis rate in the remote zone of NF-MI and PNOF-MI 6 months post-MI (Protocol 2). 102

Figure 6: Cardiac mRNA expression of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice at 2 months post-surgery (Protocol 1), in the remote and the infarcted zone (A) β -MHC, ANF and BNP (B) Collagen 1 α 1 and 1 α 2 (C) Cardiac troponin T..... 102

Figure 7: Cardiac mRNA expression of NF-MI and PNOF-MI mice at 2- and 6-months post-MI (Protocol 1 and 2), in the remote and infarcted zone (A) β -MHC, ANF and BNP (B) Collagen 1 α 1 and 1 α 2 (C) Cardiac troponin T..... 103

Liste des Figures Article 2

Figure 1: PNOF juvenile mice demonstrate early overweight associated to heart hypertrophy 131

Figure 2: CM number is decreased at D24 in hearts of PNOF mice associated with decreased cyclin genes expression 131

Figure 3: Cardiac Nrf2/Keap1 pathway is disturbed in PNOF mice at weaning 131

Figure 4: Hearts of PNOF juvenile mice have a decrease in CM proliferation at D7, associated with increased cell size..... 131

Figure 5: PNOF juvenile mice display changes in lipid profile including decreased triglycerides and increased phosphocholines..... 132

Liste des Abréviations

Ach : Acétylcholine

AGL : Acide Gras Libre

ALAT : Transaminase alanine aminotransférase

AMPK : AMP-activated protein kinase

ANP / ANF : Atrial Natriuretic Peptide / Factor

ASAT : Transaminase aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine Triphosphate

ATR : Récepteur de l'Angiotensine

BNP : Brain Natriuretic Peptide

CDK : Cyclin Dependent Kinase

CKI : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor

CM : Cardiomyocyte

CNP : C-type Natriuretic Peptide

CoA : Coenzyme A

CT : Cycle Treshold

CPT1 : Carnitine palmitoyl-transferase 1

DC : Débit Cardiaque

DOHaD : Developmental Origins of Health and Disease

DOX : Doxorubicine

ECG : Electrocardiogramme

ECM : Matrice Extracellulaire

eNOS : NO Synthase endothéliale

FACS : Fatty-Acyl-CoA Synthase

FADH₂ : Flavine adénine dinucleotide

FEVG : Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche

FGF : Fibroblast Growth Factor

FR : Fraction de Raccourcissement

GLUT1, 4 : Transporteur de glucose 1, 4

HDL : High Density Lipoprotein
HETE : Hydroxyeicosatétraénoïque
HIF1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 α
HODE : Hydroxyoctadécadiénoate
HTA : Hypertension artérielle
IGF : Insulin Growth Factor
IC : Insuffisance Cardiaque
IDM : Infarctus du Myocarde
IL-1b, 6, 8, 10 : Interleukine 1b, 6, 8, 10
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IR : Récepteur à l'insuline
I-R : Ischémie-Reperfusion
IRS : Insulin Receptor Substrate
IVA : Artère Interventriculaire Antérieure
LDL : Low Density Lipoprotein
MC4R : Récepteur aux mélanocortines de type 4
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
MLC : Myosin Light Chain
MMP2 : Métalloprotéinase de matrice de type 2
NA : Normo-Alimenté
NADH : Nicotinamide adénine dinucleotide
NCM : Non Cardiomyocyte
NO : Monoxyde d'azote
NRG1 : Neuregulin 1
LEP : Leptine
LEPR : Récepteur de la leptine
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1
PBS : Tampon Phosphate Salin
PCSK1 : Pro-hormone convertase-1

PFA : Paraformaldéhyde

PI3K : Phosphatidyl inositol-3 kinase

POMC : Pro-opiomélanocortine

PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor α

PSGA : Parasternale Grand Axe

PTP1B : Protéine-Tyrosine Phosphatase 1B

Rb : Rétinoblastome

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

RT-PCR : Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction

SA : Sur-Alimenté / Suralimentation Post-Natale

SNP : Nitroprussiate de sodium

TAB : Tissu Adipeux Blanc

TAZ : Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif

TEAD : Transcriptional Enhanced Associate Domain

TI : Taille d'Infarctus

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TNFR-1 : Superfamille des récepteurs de TNF

UCP2 : Uncoupling Protein 2

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VES : Volume d'Ejection Systolique

VTD : Volume Télédiastolique

VTS : Volume Télésystolique

WGA : Wheat Germ Agglutinin

YAP : Yes-associated protein

β -MHC : β -Myosin-Heavy-Chain

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. Surpoids, obésité et conséquences cardio-métaboliques

A. Surpoids et obésité

1. Définition et prévalence

Le surpoids et l'obésité se définissent comme un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques menant à une augmentation du poids corporel et plus particulièrement à une accumulation de masse grasseuse dans l'organisme. L'indice de masse corporelle (IMC), calculé par le rapport poids/taille² ((kg/m²), est une mesure permettant de classer les différents niveaux d'obésité, du surpoids (25 < IMC < 30) à l'obésité modérée (30 < IMC < 35), sévère (35 < IMC < 40) et morbide (IMC > 40) [1]. Il existe également d'autres méthodes d'évaluation comme la mesure du tour de taille et du pli cutané, le périmètre abdominal, le rapport taille/hanche ou encore l'impédancemétrie.

Malgré les recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le nombre de personnes présentant un surpoids ou une obésité dans le monde n'a cessé d'augmenter ces 40 dernières années. Une hausse de 28% chez les adultes et 47% chez les enfants a été observée entre 1980 et 2013 [2] et, selon certains modèles prédictifs, ces chiffres ne devraient cesser d'augmenter au cours des prochaines années [3]. En Europe, l'épidémie touche plus de la moitié des adultes et en France, 47,3% des adultes sont en surpoids et 17% sont obèses [4].

L'obésité est une pathologie complexe, d'origine multiple, faisant notamment intervenir des facteurs biologiques, dont font partie les facteurs génétiques et hormonaux, ou encore des facteurs environnementaux.

2. Facteurs génétiques

Alors que l'obésité a longtemps été considérée comme une pathologie causée par un déséquilibre de l'hygiène de vie alimentaire et de l'activité physique, des études épidémiologiques et expérimentales ont mis en évidence qu'une part de génétique pouvait être impliquée dans son installation. Il est aujourd'hui reconnu que les antécédents familiaux d'obésité représentent un important facteur hautement prédictif d'obésité infantile, puisqu'il a été montré que les enfants issus de parents obèses possèdent un risque plus élevé de développer eux-mêmes une obésité [5]. Des études d'association pangénomique ont par la

suite identifié plus de 500 gènes et loci qui, en interaction avec différents facteurs environnementaux, jouent un rôle dans l'obésité et la répartition de la graisse corporelle [6]. Cette forme d'obésité dite polygénique est la plus communément rencontrée, en opposition avec la forme monogénique qui représente seulement 5% des cas d'obésité, causée par une mutation au sein d'un seul gène. Ces mutations affectent le plus souvent les gènes de la voie hypothalamique leptine-mélanocortine impliquée dans la régulation de la prise alimentaire comme le gène du récepteur aux mélanocortines de type 4 (MC4R), de la leptine (LEP), du récepteur de la leptine (LEPR), pro-opiomélanocortine (POMC) ou encore de la pro-hormone convertase-1 (PCSK1) [7].

3. Facteurs hormonaux

La régulation de la satiété est régie par de nombreuses hormones à travers l'axe intestin/cerveau. Les hormones digestives (ghréline, glucagon-like peptide GLP, ...), l'insuline, la leptine et les hormones hypothalamiques dans le système nerveux central (POMC, NYP) constituent des signaux permettant la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Des dérégulations de ces voies de signalisation, à travers la sécrétion augmentée ou diminuée de ces hormones par exemple, peuvent donc entraîner des perturbations de ces mécanismes de régulation et conduire à une augmentation du poids corporel. D'autres perturbations hormonales peuvent être à l'origine du développement d'une obésité comme c'est le cas en situation d'hypothyroïdie ou d'hypercorticisme, en touchant entre autres au métabolisme de base [8].

4. Facteurs environnementaux

Une grande diversité de facteurs environnementaux joue un rôle majeur dans l'apparition et l'installation de l'obésité [9]. Dans les pays développés, la surnutrition et l'absence d'activité physique en sont les principales causes, néanmoins, la pollution, le stress, le statut socioéconomique, le microbiote intestinal, les perturbateurs endocriniens ou encore la prise de certains médicaments sont également des facteurs impliqués [8]. Si l'environnement d'un individu a un impact majeur sur sa prise de poids tout au long de sa vie, l'environnement utérin est tout aussi important. Le stress, le tabac ou encore l'alimentation maternelle au cours de la grossesse ont tous été associés à une augmentation du risque d'obésité infantile [10].

Tous ces facteurs sont étroitement imbriqués et s'influencent les uns les autres pour finalement aboutir à une accumulation excessive de graisse corporelle et à l'apparition d'un ensemble de comorbidités métaboliques et cardiovasculaires, c'est pourquoi il est important d'en comprendre les mécanismes afin de prévenir au mieux leur installation.

B. Syndrome métabolique et pathologies cardiovasculaires

1. Tissu adipeux

La hausse de poids corporel observée en situation de surpoids et d'obésité se traduit par une augmentation de l'accumulation de tissu adipeux. Il en existe deux types chez les mammifères. Le tissu adipeux brun, qui possède un rôle essentiel dans la thermogénèse mais qui est peu présent chez l'humain excepté chez le nouveau-né, et le tissu adipeux blanc, qui possède un rôle principal dans le stockage des lipides et dans la libération d'acides gras en fonction des besoins énergétiques de l'organisme. Le tissu adipeux blanc est classifié en 2 catégories selon sa localisation, le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral, et chacune de ces zones possède des caractéristiques biochimiques et des fonctions métaboliques qui leur sont propres.

Ces tissus sont composés en grande majorité d'adipocytes, impliqués dans le stockage des graisses sous la forme de triglycérides (99%), de composés saponifiables (0,6%), de cholestérol (0,4%) et de phospholipides (0,2%), ainsi que de cellules vasculaires, immunitaires et inflammatoires ou encore de tissu conjonctif et nerveux [11].

En plus de sa fonction de stockage, le tissu adipeux a la capacité d'intégrer des informations provenant du système nerveux central, digestif, endocrinien et du tissu adipeux lui-même, grâce à la présence de différents récepteurs sensibles, par exemple, aux glucocorticoïdes, aux œstrogènes, aux androgènes, aux catécholamines, à l'insuline et la leptine, mais aussi aux chimiokines. Il peut également interagir avec un grand nombre d'organes comme le foie, les muscles, le cœur, le cerveau, les intestins, etc. à travers la sécrétion d'adipokines. Parmi le vaste sécrétome adipocytaire regroupant plus de 600 adipokines on retrouve notamment la leptine, l'adiponectine, l'apeline, la résistine, le FGF21 (Fibroblast Growth Factor 21), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) mais également des adipokines inflammatoires comme le TNF α , l'IL-6, l'IL-10 et le MCP-1 [12, 13]. Ces molécules biologiquement actives peuvent ainsi influencer la satiété, la balance

énergétique, l'immunité, le métabolisme lipidique et glucidique, la pression artérielle ou encore la sensibilité à l'insuline [11].

Le tissu adipeux régule donc les réserves lipidiques de l'organisme et agit comme organe endocrine et paracrine. En situation de balance énergétique positive, le tissu adipeux va s'étendre en augmentant la taille et le nombre de ses adipocytes. Cependant, une accumulation trop importante de ces adipocytes conduit d'une part à une sécrétion excessive de cytokines inflammatoires entraînant la mise en place d'un état pro-inflammatoire général [14, 15] et d'autre part à l'apparition d'anomalies métaboliques engendrées par la libération altérée d'adipokines et de lipides pouvant mener au développement d'un diabète de type 2 et à des dyslipidémies [12]. En outre, l'obésité est également associée aux maladies cardiovasculaires, à l'apnée du sommeil ou encore à certains cancers [16-18].

2. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est une entité clinico-biologique, proposée par Reaven en 1988, qui regroupe un ensemble de facteurs de risque métaboliques, l'obésité abdominale, l'hyperglycémie à jeun, la résistance à l'insuline, l'hypertriglycéridémie et l'élévation de la pression artérielle, dont la co-existence augmente considérablement le risque cardiovasculaire [19]. Il a fait l'objet de diverses définitions controversées, dont la dernière est une définition consensus parue en 2009 [20]. Avec cette définition, la présence d'au moins trois des cinq composants suivants chez un individu permet de diagnostiquer un syndrome métabolique :

- Obésité abdominale (facteur principal) : périmètre abdominal > 94 cm pour les hommes et 80 cm pour les femmes en Europe. 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

Obésité abdominale :

L'extension excessive de tissu adipeux au niveau viscéral mène au déséquilibre de certaines adipokines sécrétées, comme c'est le cas pour la leptine. Comme évoqué précédemment, cette hormone joue un rôle dans la régulation hypothalamique de la prise alimentaire en réduisant l'appétit, mais elle exerce également de nombreux effets pléiotropes notamment au niveau de la balance énergétique, de l'inflammation ou encore du métabolisme du glucose. Sa libération est proportionnelle à la masse grasseuse c'est pourquoi une hyper-leptinémie est généralement observée chez les personnes atteintes d'obésité. Malgré ses effets anorexigènes, une élévation du taux plasmatique de leptine en situation d'obésité serait associée au développement d'une leptinorésistance [21]. De plus, l'hyper-leptinémie est reliée à l'obésité et à l'insulinorésistance c'est pourquoi le dosage de ses taux circulants comme biomarqueur du risque métabolique et cardiovasculaire a été proposé [22].

Dyslipidémie :

La surcharge pondérale engendrée par l'accumulation de tissu adipeux entraîne également l'altération du métabolisme lipidique. Les lipides, hydrophobes et insolubles dans le sang, sont transportés à travers l'organisme par des lipoprotéines afin de remplir un grand nombre de fonctions cellulaires. Ces complexes permettent la prise en charge des différents types de lipides depuis leur absorption par les intestins et leur transport vers les différents tissus et organes. Parmi ces lipoprotéines on trouve notamment les LDL (Low Density Lipoprotein) qui permettent le transport du cholestérol vers les tissus périphériques et les HDL (High Density Lipoprotein) impliquées dans le transport inverse du cholestérol des tissus vers le foie. Chez les individus obèses, des changements qualitatifs et quantitatifs des lipoprotéines circulantes sont observés et mettent en évidence la présence d'une dyslipidémie. La dyslipidémie s'observe par une élévation des taux de triglycérides, de cholestérol total et de LDL-cholestérol et une diminution des taux de HDL-cholestérol, mesurés à jeun [23]. Il a d'ailleurs été démontré que ces taux sont de robustes facteurs prédictifs du risque cardiovasculaire [24].

Insulinorésistance :

La régulation de la glycémie dans des valeurs physiologiques est un processus essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. Le taux de glucose sanguin fluctue au cours de la journée entre les périodes d'apport alimentaire et de jeûne, c'est pourquoi il est finement régulé par deux hormones, l'insuline et le glucagon. L'insuline est hypoglycémiante, elle permet l'entrée et le stockage du glucose dans les cellules suite à une augmentation de la glycémie, généralement après un repas. Le glucagon est l'hormone du jeûne, il permet la libération du glucose par le foie dans la circulation entre deux repas. En situation d'obésité, la présence d'une insulinorésistance est souvent observée [17]. Elle correspond à une diminution de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline et se caractérise par l'installation d'une hyperglycémie associée à une hyper-insulinémie visant à maintenir l'homéostasie glucidique. Cependant à terme, les cellules bêta-pancréatiques chargées de la production d'insuline s'épuisent ce qui conduit au développement d'un diabète de type II [15].

Hypertension artérielle :

L'obésité entraîne également un risque accru de développer une hypertension artérielle (HTA) [17]. Plusieurs facteurs peuvent être mis en cause impliquant une activation excessive du système nerveux sympathique, des dysfonctions de la fonction rénale et du système rénine angiotensine ou encore de la fonction endothéliale par réduction de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) dont le rôle vasodilatateur des vaisseaux sanguins est largement reconnu [25]. Des mécanismes de stress oxydant, d'insulinorésistance et d'inflammation jouent aussi un rôle direct et indirect dans l'augmentation de la résistance vasculaire systémique et dans l'élévation de la pression artérielle [26].

3. Pathologies cardiovasculaires

Le surpoids et l'obésité sont des facteurs impliqués dans l'apparition de multiples pathologies cardiovasculaires [27]. En effet, comme précédemment développé, la présence d'une dyslipidémie et d'un statut pro-inflammatoire associés à une dysfonction endothéliale est propice au développement de l'hypertension artérielle, mais également de l'athérosclérose.

De nombreuses études ont montré la présence de changements morphologiques cardiaques chez des patients obèses et hypertendus. Ce remodelage cardiaque, causé en partie par les

altérations hémodynamiques de l'HTA, se traduit généralement par une augmentation de la cavité ventriculaire et de l'épaisseur de sa paroi, synonymes de dilatation et d'hypertrophie [28, 29]. Un tel remodelage pourrait contribuer au développement de dysfonctions diastoliques également observées chez ces patients [28]. Une étude ayant analysé les paramètres de la fonction de remplissage par technique échocardiographique a montré qu'un IMC élevé était corrélé avec la présence d'une dysfonction diastolique, indépendamment de facteurs de risque comme l'HTA, le diabète ou la masse ventriculaire gauche [30]. En revanche, malgré des résultats divergents selon les études, la fonction systolique n'est pas ou peu impactée par la présence d'un surpoids ou d'une obésité [28].

Enfin, il existe un lien étroit entre l'obésité et l'insuffisance cardiaque [31]. Il a été mis en évidence que 32%-49% des patients souffrant d'insuffisance cardiaque sont obèses. Les mécanismes d'explication sont divers et impliquent la présence d'HTA, d'une dysfonction diastolique, d'un remodelage ventriculaire défavorable, de l'inflammation qui favorise la fibrose cardiaque ou encore de la lipotoxicité associée à une accumulation de triglycérides cardiaques [27].

Il est important de souligner l'existence d'un paradoxe de l'obésité. Ce phénomène décrit que certains individus en surpoids ou obèses atteints de pathologies cardiovasculaires présentent un pronostic plus favorable que leurs homologues plus maigres. Ce paradoxe, dont l'existence reste contestée, a été observé notamment chez des patients insuffisants cardiaques ou après un infarctus du myocarde [27, 32, 33] et, bien que les raisons ne soient pas précisément déterminées, certains auteurs avancent qu'elles pourraient être reliées à de plus grandes réserves métaboliques, à une réponse au système rénine-angiotensine atténuée ou encore à la sécrétion de certaines cytokines protectrices [32].

C. Obésité infantile

En 2007, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a créé la "World Health Organization European Childhood Obesity Surveillance" (COSI) dans le but de suivre l'évolution de la prévalence de l'obésité parmi les enfants de 33 pays d'Europe [34]. Selon les données du dernier rapport, entre 2018 et 2020, 29% des enfants âgés entre 7 et 9 ans étaient atteints de surpoids ou d'obésité. En 2019, une étude rapportait déjà qu'au cours de la période 2006 à 2016, 17,9% des enfants Européens âgés de 2 à 7 ans étaient en situation de surpoids ou

d'obésité [35]. Enfin, toujours selon l'OMS, en 2020, 38,9 millions d'enfants de moins de 5 ans présentaient un surpoids ou une obésité.

Il a été montré que l'obésité infantile est associée à un grand nombre de comorbidités médicales, dont les plus communes sont l'hypertension artérielle, l'altération de la tolérance au glucose ou encore la présence d'une hypercholestérolémie [36]. De plus, les enfants et adolescents obèses ont 5 fois plus de risque de l'être également à l'âge adulte [37]. L'étude de l'obésité infantile et ses conséquences sur le métabolisme et la fonction cardiovasculaire, sur le court et le long terme, représente donc un enjeu majeur dans la compréhension et la prise en charge de cette pathologie.

II. Programmation périnatale

A. Théorie de Barker

Les premiers liens entre l'environnement fœtal et la santé à l'âge adulte ont vu le jour dans les années 1970 avec les travaux de Dörner [38]. Puis ce sont les recherches de Barker, dans les années 80, qui ont permis de mettre en évidence que des enfants nés avec un faible poids de naissance possédaient un risque plus élevé de maladies cardiaques d'origine ischémique [39, 40], d'hypertension artérielle ou encore de diabète de type 2 à l'âge adulte [41, 42]. Il introduit alors le concept de « phénotype économe » et propose que l'exposition intra-utérine ou très tôt durant l'enfance à une sous-alimentation entraînerait des modifications permanentes dans la structure et la fonction de certains organes et tissus clés [42, 43]. Barker fait notamment le parallèle avec le développement des cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques responsables de la sécrétion d'insuline et mises en cause dans le développement du diabète de type 2. D'après lui, une déficience d'apport en acides aminés causée par de pauvres apports nutritionnels, provoquerait une diminution de la croissance de ces îlots et donc de leur fonction. Cette faible croissance ne serait néanmoins pas un problème en condition de sous-alimentation prolongée mais se révélerait être mal-adaptée dès lors que l'individu retrouve une alimentation « normale » ou importante, entraînant ainsi le développement d'un diabète de type 2 sur le long terme.

B. Concept des Origines Développementales de la Santé

Les observations initiales de Barker ont par la suite donné lieu à un grand nombre d'études épidémiologiques et expérimentales s'intéressant à l'impact de l'environnement nutritionnel précoce sur la santé à l'âge adulte.

Ainsi, il a été mis en évidence que les enfants nés avec un faible ou un fort poids de naissance (< 2,5 kg ou > 4 kg respectivement) possédaient un risque cardiovasculaire augmenté ultérieurement [44]. La période périnatale regroupe la gestation et la lactation durant laquelle l'alimentation du nouveau-né dépend essentiellement des nutriments apportés par la mère. L'obésité maternelle pendant la grossesse induit très fréquemment un diabète gestationnel et est la principale cause de macrosomie fœtale (poids de naissance > 4 kg). Des études ont montré que les enfants nés de mères obèses présentaient une augmentation précoce du poids corporel et de l'adiposité ainsi qu'un risque plus élevé de morbidité et mortalité lié aux maladies cardiovasculaires et coronariennes à l'âge adulte [45].

Expérimentalement, des études menées chez des rats ou des souris ont montré que les descendants issus de mères rendues obèses par un régime hypercalorique présentaient des altérations au niveau du profil lipidique, du métabolisme du glucose, une insulino-résistance ainsi que de l'hypertension [46-48].

Ces recherches ont ainsi fait émerger le concept d'origines développementales de la santé (DOHaD : Developmental Origins of Health and Disease). Cette théorie suggère que des facteurs hormonaux ou nutritionnels durant la période fœtale peuvent mener à des changements d'expression génétique majeurs dans le but initial d'adapter l'organisme aux différents changements de son environnement. Cependant, ces adaptations peuvent s'avérer inappropriées et prédisposer l'individu à des dysfonctions au niveau de certains organes voire au développement de certaines pathologies si l'environnement postnatal ne s'accorde pas avec l'orientation phénotypique de l'expression génomique.

Par ailleurs, chez la plupart des mammifères, le développement de certains organes n'est pas complet à la naissance et continue au cours de la période postnatale immédiate. L'organisme présente alors une grande plasticité, le rendant sensible aux différents signaux de son environnement notamment nutritionnels.

De nombreuses études épidémiologiques se sont intéressées au lien entre l'alimentation durant les premiers mois de vie et le risque de développer une obésité. Elles ont ainsi montré

que l'allaitement maternel était un facteur protecteur de l'obésité, chez l'enfant [49-51] et à l'âge adulte [52] et qu'il existait également un effet dose-réponse entre la durée de l'allaitement maternel et la réduction du risque d'obésité infantile selon une relation linéaire inverse [53]. Enfin, un effet bénéfique de l'allaitement maternel sur l'aptitude cardiorespiratoire a également été observé chez des enfants et adolescents de 9 et 15 ans [54]. L'une des explications pourrait venir de la composition des laits artificiels, plus riches en graisse, minéraux et protéines que le lait maternel, en raison notamment de l'utilisation de lait de vache pour la fabrication de la plupart de ces laits [55]. Chez le rat, il a été observé que des petits allaités par des mères nourries au régime « cafétéria » après la mise-bas présentaient des altérations précoces de gènes impliqués dans le métabolisme hépatique notamment la voie de l'AMPK [56].

Ainsi, les trajectoires de croissance dès le plus jeune âge sont déterminantes dans le développement de pathologies cardio-métaboliques et sont liées au concept de programmation développementale.

C. **Modèle de suralimentation postnatale**

Afin d'étudier spécifiquement les conséquences de la suralimentation postnatale (SA), un modèle expérimental basé sur la réduction de taille de la portée a été développé. Ce modèle est aujourd'hui largement utilisé dans l'étude des effets de l'alimentation précoce chez le rat et la souris. Les nouveau-nés soumis à une SA sont élevés dans une petite portée composée de 3 à 4 petits tandis que les nouveau-nés contrôles sont maintenus dans une portée de 8 à 12 petits (Figure 1). Cette réduction de taille de la portée permet d'augmenter l'accès des petits au lait maternel [57] et certaines études ont également montré que le lait provenant de petites portées possédait une valeur énergétique importante et était enrichi en triglycérides [58]. Cette diminution de la taille de la portée a pour conséquence une hausse de 10% à 56% et de 30% du poids corporel au sevrage respectivement chez les rats et souris suralimentés (SA), certaines variations pouvant notamment s'expliquer par des différences de souches et de taille des portées [59]. De manière intéressante, après le sevrage, lorsque les animaux retrouvent une alimentation standard identique aux animaux contrôles, cette hausse du poids corporel perdure bien que de façon plus modeste, d'en moyenne 15%. L'un des éléments responsables de ce maintien de surpoids à l'âge adulte est l'augmentation de la prise

alimentaire des animaux SA observée après le sevrage [60-62]. Plagemann *et al.* ont mis en évidence des altérations épigénétiques au niveau du promoteur du gène de la proopiomélanocortine (POMC) dans l'hypothalamus. La POMC est la principale neurohormone anorexigénique permettant de réguler la prise alimentaire en présence d'insuline et de leptine. L'hyperméthylation de son promoteur comme celle observée chez des rats SA suggère une diminution de l'expression du gène, et donc une altération des circuits hypothalamiques impliqués dans la régulation de la satiété, de la prise alimentaire et par voie de conséquence du poids corporel [63].

Ainsi, la SA induite via la réduction de la taille de la portée représente un modèle expérimental pertinent pour étudier l'impact de changements nutritionnels précoces sur l'organisme induisant un surpoids modéré mais permanent.

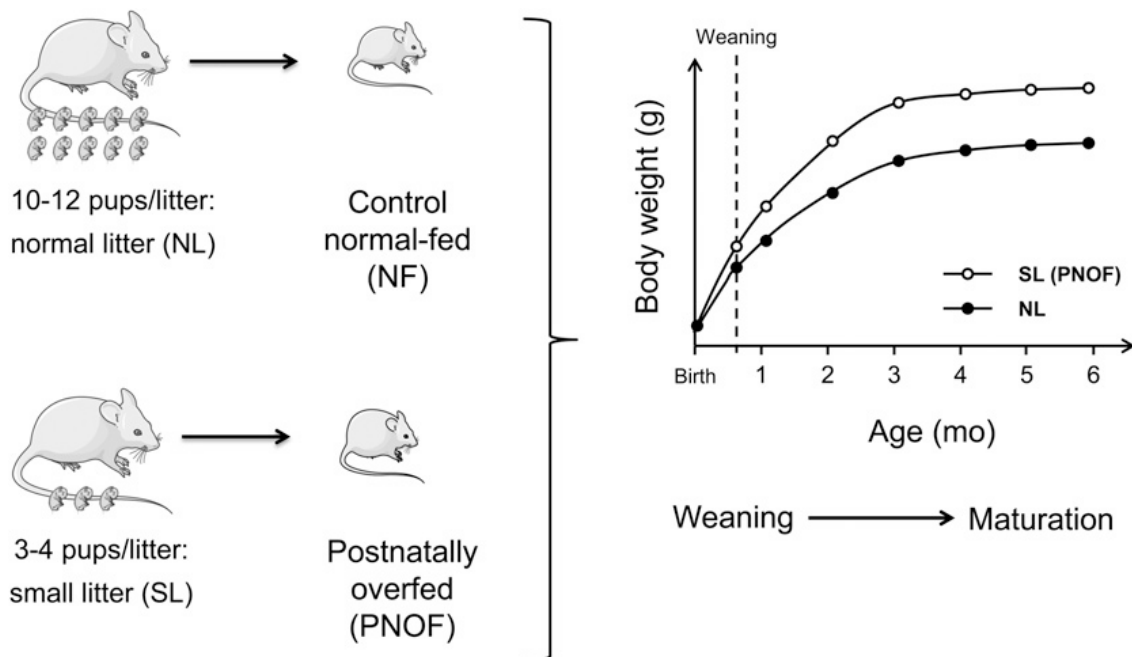


Figure 1 : Schématisation du modèle de suralimentation postnatale (SA) par réduction de la taille de la portée chez la souris et ses conséquences sur le poids corporel [59].

La portée contrôle est constituée de 10-12 petits par mère (normo-alimenté), alors que la portée SA est constituée de 3- 4 petits par mère. Une augmentation du poids corporel est observée au sevrage et se maintient tout au long de la vie.

D. Conséquences cardio-métaboliques de la suralimentation postnatale

1. La SA altère le métabolisme général et cardiaque

Comme mentionné précédemment, les rongeurs SA possèdent un poids corporel significativement plus important que leur contrôle au sevrage et ce surpoids persiste au cours de la croissance et de la maturation [64-67]. Cette hausse de poids corporel n'est pas liée à une élévation globale de la croissance corporelle incluant les os, les muscles et les organes mais plutôt à une augmentation d'adiposité [68]. L'analyse de la composition corporelle totale grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a démontré que les souris soumises à une suralimentation postnatale (SA) possèdent une masse grasse plus importante que la masse maigre [69]. Des analyses plus poussées de la localisation de la graisse chez des rats SA ont montré que celle-ci est augmentée au niveau sous-cutané et viscéral (épididymal, rétropéritonéal, périrénal et mésentérique) au sevrage [70] et plus tard [57, 61, 62] et associée à une augmentation de la surface des adipocytes [71-73].

Chez les rongeurs SA, le tissu adipeux blanc (TAB), responsable du stockage des graisses dans l'organisme, présente également des différences significatives dans l'expression de protéines clés impliquées dans la réponse à l'insuline, telle que la sous-expression du substrat au récepteur à l'insuline IRS1, de la protéine kinase B (Akt2) et du transporteur de glucose 4 (GLUT4) [74] ainsi qu'au niveau du métabolisme glucocorticoïde adipeux [72, 73, 75, 76]. La surexpression de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α), son récepteur TNFR-1, l'interleukine-6 (IL-6) ou encore la résistine a également été rapportée dans le TAB de rats SA [75]. Des données récentes suggèrent également que la SA viendrait altérer le potentiel de différenciation des cellules souches adipeuses sous-cutanées mésenchymateuses ce qui pourrait être impliqué dans l'augmentation d'adiposité observée chez les souris SA néonatales [77].

Ce déséquilibre de proportion grasseuse est associé à d'autres modifications endocrines et métaboliques. En effet, une élévation des taux d'insuline plasmatique a été observée chez des animaux SA, rats et souris, jeunes et adultes [60, 63, 69, 72, 73, 78, 79]. Une telle augmentation suggère la présence d'une insulino-résistance [80], hypothèse corroborée par une élévation du taux de glucose à jeun [60, 78] mais également d'une intolérance au glucose [57, 58, 78, 81] et d'une hausse de sécrétion d'insuline en réponse au glucose [57, 65]. Il a

également été observé que les taux de leptine plasmatiques sont augmentés chez les animaux SA [57, 73, 78, 79, 82]. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation d'adiposité observée chez ces mêmes animaux, puisque la production de leptine est liée aux adipocytes et l'expression génique de la leptine est augmentée dans le tissu adipeux blanc et brun de rats SA [83]. Lorsque l'adiposité augmente, les taux lipidiques circulants des rongeurs SA sont également perturbés. Une augmentation des acides gras libres, des triglycérides et du cholestérol, associée à une diminution des taux de cholestérol-HDL a été décrite dans de nombreuses publications [73, 74, 82, 84-86]. Néanmoins, certaines études n'ont rapporté aucunes variations lipidiques, ces divergences pouvant être liées aux différences de souches, d'âges et de conditions physiopathologiques des animaux au moment où le profil lipidique a été réalisé. Ces changements de profil lipidique et d'adiposité pourraient être responsables d'un état pro-inflammatoire chez les animaux SA, puisque le tissu adipeux est capable de libérer des adipocytokines dont certaines ont été décrites comme étant impliquées dans le développement de pathologies cardiovasculaires [87, 88].

Des analyses du métabolisme cardiovasculaire ont également montré une altération de la signalisation de l'insuline dans le myocarde de rongeurs SA [82]. Ces changements apparaissent de façon précoce, dès le sevrage chez les souris SA, avec la diminution de l'expression du récepteur à l'insuline (IR)- β , de la phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K), du GLUT4 et du ratio pAkt/Akt et de la phosphorylation de son substrat IRS-1 ou encore l'augmentation de l'expression de GLUT1 et du ratio pAMPK α /AMPK α [89, 90]. La localisation du GLUT4 par immunofluorescence dans les cardiomyocytes a également montré une baisse de translocation du récepteur à la membrane plasmique [82]. Cependant, une autre étude a observé que l'expression protéique du GLUT4 était augmentée chez des rats SA [78]. Des expériences sur aorte et cœur isolé ont montré une baisse de réponse à l'insuline due à une sous-activation de la voie PI3K/Akt et une suractivation de la cascade MAPK [63]. Dans les artères et le cœur, la résistance à l'insuline pourrait venir d'un état pro-inflammatoire puisque les taux de cytokines pro-inflammatoires et marqueurs pro-oxydants se trouvent significativement augmentés [82]. Enfin, dans le cœur de souris SA juvéniles, après le sevrage, l'activité de la lactate déshydrogénase et de la synthase citrate est augmentée et accompagnée d'une hausse d'oxydation des glucides, d'une baisse d'expression ARNm de la carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT1) et PPAR α et d'une hausse d'expression de l'UCP2, le tout indiquant un switch du métabolisme préférentiellement vers les glucides [90].

2. La SA altère la fonction vasculaire et rénale

Les mesures de pression artérielle *in vivo* ont révélé une augmentation modérée mais significative de 10-20 mmHg de la pression artérielle systolique et diastolique chez des souris et rats SA adultes [59, 83, 86, 91-94]. La pression artérielle est très dépendante du débit cardiaque et de la résistance vasculaire ; cependant, les analyses de réactivité vasculaire d'artères collectées chez des rongeurs SA montrent des résultats divergents. Sur des anneaux aortiques isolés de rats, des auteurs ont démontré une diminution de la vasorelaxation en réponse à l'acétylcholine (Ach) mais pas au nitroprussiate de sodium (SNP) [86], suggérant une dysfonction endothéliale [95]. L'insuline exerce un effet vasodilatateur endothélial-dépendant à travers la production de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales [96]. D'autres expériences de réactivité vasculaire ont montré que des rats SA présentent une baisse de capacité vasodilatatrice en réponse à l'insuline par réduction de phosphorylation et donc d'activation de l'enzyme eNOS impliquée dans la production de NO [82]. Ces mêmes auteurs ont montré une réponse altérée à l'Ach mais aussi au SNP [82] suggérant que la réponse des cellules endothéliales mais aussi des cellules musculaires lisses est altérée. De plus, la réponse contractile à la phényléphrine est également augmentée dans des segments aortiques de rats SA [86] traduisant une augmentation de la réponse vasoconstrictrice α -adrénergique-dépendante. Cependant, dans notre laboratoire, nous n'avons pas détecté de différences de réponse vasculaire entre les animaux SA et contrôles [60]. Ensemble, ces résultats indiquent que la réactivité vasculaire peut être altérée par la SA mais, comme pour le métabolisme, cette altération pourrait être influencée par la souche et le stade de maturité des animaux.

Par ailleurs, des altérations de morphologie vasculaire ont été observées chez des rats adultes SA avec une teneur accrue en collagène et une densité de fibres élastiques plus faible [97], un épaissement de la paroi aortique parallèlement à une réduction de l'intégrité de l'élastine et augmentation de la pression artérielle [92]. Une hausse d'expression et d'activité aortique et plasmatique de la metalloprotéinase de matrice de type 2 (MMP2) a été mise en évidence et l'activité aortique de la MMP2 a été montrée comme étant positivement corrélée à l'épaisseur de la paroi aortique [92]. Les auteurs suggèrent qu'une suractivation de la MMP2 aortique pourrait être expliquée par des désordres métaboliques tels que des taux d'insuline et/ou de lipides plasmatiques élevés comme ceux observés chez les rongeurs SA [98].

D'autres paramètres impliqués dans la régulation de la pression artérielle pourraient également être affectés par la SA comme la dysfonction rénale, déterminant majeur dans le développement de pathologies cardiovasculaires. De nombreuses études rapportent que des rats SA développent une hypertension systémique associée à une dysfonction rénale à l'âge adulte [99, 100]. Une altération de la fonction et de la structure rénale a été observée chez de jeunes rats SA [101] mais également adultes [99, 102, 103] comprenant le développement progressif d'une glomérulosclérose, la diminution accélérée du nombre de néphrons, l'apoptose de cellules corticales [91], l'altération du taux de filtration glomérulaire [99] et une sénescence rénale plus rapide avec l'âge [102]. De plus, le système rénine-angiotensine rénal est perturbé avec une expression augmentée de rénine et du récepteur de l'angiotensine de type II [94, 104]. Considérant l'importance majeure du système rénine-angiotensine-aldostérone dans la régulation de la pression artérielle, ces modifications pourraient avoir un impact sur les valeurs de pression artérielle des rongeurs SA. Enfin, certains auteurs ont également montré que la SA pouvait augmenter la capacité des glandes surrénales à sécréter des catécholamines [105] ou encore de la corticostérone [72, 73]. Aux vues des effets pro-hypertenseurs de ces hormones surrénales, des dérégulations humorales pourraient donc être impliquées dans l'hypertension induite par la SA.

Ainsi, la SA altère non seulement la réactivité et la structure vasculaire, mais les dysfonctions rénales et humorales qu'elle induit pourraient également jouer un rôle dans le développement d'une pression artérielle systémique augmentée.

3. La SA altère l'architecture et la structure du cœur

La présence d'altérations métaboliques induites par la SA pourrait changer la structure du cœur en modulant le devenir des cellules cardiaques. A la naissance, les cœurs de mammifères passent d'un environnement pauvre en oxygène à 20% d'oxygène. Cette brutale « hyperoxie relative » mène à un changement métabolique qui passe d'une utilisation préférentielle de la glycolyse anaérobie pour la phosphorylation oxydative mitochondriale dépendante de l'oxygène, requise pour la croissance des organes et de l'organisme [106]. De manière concomitante, le cœur perd progressivement ses capacités régénératives. Les cardiomyocytes sortent du cycle cellulaire, arrêtent leur prolifération et développent une hypertrophie, synonyme de maturation [107]. Les fibroblastes deviennent eux aussi plus gros avec une diminution du renouvellement cellulaire comparé aux fibroblastes fœtaux [108]. De plus,

après la naissance, la composition et la rigidité de la matrice extracellulaire (ECM) se modifient. L'ECM d'un cœur adulte est enrichie en collagène de type 1 et de laminine avec des niveaux réduits de fibronectine et périostine [109].

Des stimuli relatifs à des changements inadaptés de la nutrition néonatale pourraient venir perturber la prolifération et la différenciation des cardiomyocytes et, de ce fait, affecter sur le court et long terme la fonction cardiaque et vasculaire. Cela a été observé dans plusieurs modèles d'animaux suralimentés tels que le zebrafish, les rongeurs et la brebis [86, 110-112], où plusieurs études rapportent une morphométrie cardiaque altérée et l'expression de protéines marqueurs d'hypertrophie.

A l'échelle de l'organe, la SA est associée à une hypertrophie cardiaque au sevrage et à l'âge adulte, qui se caractérise par une augmentation du diamètre des cardiomyocytes ou de la masse du cœur normalisée à la longueur tibiale [79, 84, 86, 89]. De plus, les cœurs de rats SA présentent une hypertrophie du ventricule gauche ainsi qu'une augmentation de l'aire des cardiomyocytes et une diminution de la densité des vaisseaux [84]. Cependant cette hypertrophie myocardique n'est pas retrouvée dans toutes les études [60, 69].

Enfin, des analyses histologiques au Rouge Sirius ont montré que des souris mâles SA ont une hausse de dépôt de collagène dans le ventricule gauche en condition non pathologique [69, 79, 113]. Des rats adultes SA présentent également une densité de collagène périvasculaire et interstitielle plus importante [86] et cette augmentation de fibrose est combinée à une plus grande expression et activité des MMP [60]. Il reste cependant à déterminer s'il s'agit d'un effet direct de la SA sur les fibroblastes cardiaques. De tels changements structurels ventriculaires liés à une fibrose augmentée pourraient être responsables de modifications architecturales du ventricule et par voie de conséquence d'une altération de la fonction contractile [86]. De plus, une hausse d'expression d'ARNm des peptides natriurétiques atrial (ANP) et cérébral (BNP) dans les cœurs de souris SA suggère une activation de voies pro-hypertrophiques clés [79].

4. La SA induit des altérations d'expression génique dans le cœur

Pour pouvoir expliquer les altérations métaboliques et cardiovasculaires observées sur le long terme chez les animaux SA, l'implication de la programmation fœtale à travers des modifications d'expression génique a été suggérée. Comme évoqué précédemment, il a déjà été observé que l'obésité au cours de la grossesse augmente le risque pour la descendance de

développer des maladies cardiovasculaires chez l'animal et l'humain [114]. L'expression altérée de gènes cruciaux telle que l'augmentation du gène *Myh7* codant pour la β -MHC, du BNP ou encore de *Gata4* au cours du développement fœtal, pourrait mener à une hausse du risque cardiovasculaire. De façon similaire, une comparaison de l'expression génique entre des cœurs de souris SA et NA au sevrage a montré que l'expression d'environ 822 gènes était modifiée à la suite d'une SA [69]. Des analyses approfondies ont ensuite réduit ces résultats à 102 gènes sous ou surexprimés et, parmi eux, 12% des gènes surexprimés correspondaient à des gènes de structure codant principalement pour le collagène.

L'expression génique étant aussi régulée par des modifications épigénétiques à travers l'acétylation des histones, la méthylation de l'ADN ou des mécanismes basés sur des ARN interférants, la SA pourrait également programmer un surpoids et un risque cardiovasculaire via ces mécanismes épigénétiques [115]. Chez les enfants, la durée d'allaitement a un impact sur l'épigénome métabolique [116]. Chez des rats SA, Plagemann a été le premier à rapporter une augmentation de la méthylation sur le promoteur du gène anorexigénique proopiomélanocortine dans l'hypothalamus, démontrant une mauvaise programmation épigénétique des voies de la satiété dans le cerveau [63]. D'autres groupes ont aussi décrit des changements épigénétiques dans le muscle strié squelettique [117], le foie [118] ou le pancréas [119] associés à une insulino-résistance chez les animaux SA. Dans le cœur, une étude a analysé l'impact d'une exposition maternelle à un régime riche en graisse sur des marqueurs épigénétiques de la descendance chez le rat. Ils ont rapporté des altérations d'ADN et de méthylation des histones menant à l'activation de gènes pro-hypertrophiques et pro-fibrotiques dans le cœur, ce qui pourrait avoir un rôle dans le risque cardiovasculaire induit par la SA [120]. De plus, une altération de la voie de l'inflammasome NLRP3 dans le myocarde a été notée [121]. Sa signalisation est régulée par le microARN miR-193b, également impacté par la SA. L'implication d'une régulation par les microARN a été mise en évidence dans la santé cardiaque de descendants exposés à un régime maternel riche en graisse [122] et cela pourrait jouer un rôle important dans les effets délétères de la SA.

5. La SA est associée à une augmentation du stress oxydant et une altération mitochondriale dans le cœur

Les mitochondries sont des organites particulièrement abondants dans les cellules cardiaques et jouent un rôle central dans la fonction des cardiomyocytes mais aussi dans la production

d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). De ce fait, une dysfonction mitochondriale pourrait mener à une production excessive de radicaux libres et à une altération des bioénergétiques ventriculaires. Dans les cœurs de souris SA, après le sevrage, une analyse ultra structurale démontre des dommages mitochondriaux sans altération des complexes de phosphorylation oxydative [90]. Une étude a été conduite pour explorer la fonction mitochondriale en condition physiologique ou de stress comme l'hypoxie/réoxygénation (H-R) dans des cœurs de rats SA [85]. Ils ont observé une dérégulation des capacités de respiration mitochondriale chez des animaux, jeunes et adultes, et plus spécifiquement après une stimulation avec de l'ADP (état 3). Dans les cardiomyocytes, les ROS sont principalement produits par les complexes I et III de la chaîne respiratoire, des dysfonctions mitochondriales pourraient donc entraîner une hausse de production de ROS. Un déséquilibre entre la production de ROS et l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase pourrait également entraîner un stress oxydant comme décrit chez des cœurs d'adultes SA [59, 60, 69, 86]. L'évaluation directe de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique [123] a démontré une augmentation de la production de ces espèces dans les cœurs de rongeurs SA [69, 80]. De plus, une augmentation du marqueur de dommages lipidiques, 4-hydroxynonanal, a été observée chez des souris SA juvéniles [90]. Le stress oxydant active des voies hypertrophiques et pro-inflammatoires et pourrait être en partie responsable d'une hypertrophie cardiaque et d'une hausse de dépôts de collagène tel que mentionné précédemment [124]. En effet, l'inflammation et les cellules immunitaires sont cruciales dans l'induction, le développement et la progression vers la chronicité de certaines pathologies cardiovasculaires sévères comme l'hypertension [125], l'athérosclérose [126] ou encore de pathologies cardiaques affectant les processus d'altération et de réparation du cœur [127] et impliquées dans les réponses immunitaires innées et adaptatives [128, 129]. Encore une fois, ces changements biochimiques associés à un statut inflammatoire augmenté et du stress oxydant pourraient être impliqués dans les altérations de la fonction cardiaque contractile et prédisposer le cœur à une plus grande sensibilité aux lésions ischémiques ou toxiques.

6. La SA altère la fonction cardiaque *in vivo*

L'analyse échocardiographique permet d'étudier comment la SA affecte la fonction cardiaque globale *in vivo* chez l'animal jeune et âgé. De manière intéressante, les souris SA de 2 à 3 mois

présentent initialement une fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) plus importante que celle des souris contrôles. Cependant, celle-ci diminue graduellement au cours du temps pour finalement être significativement réduite à 7 mois, tout en étant associée à un diamètre interne ventriculaire augmenté [69, 80]. Une autre étude chez le rat a montré une augmentation significative de l'épaississement de la paroi postérieure du VG et du septum interventriculaire à 120 jours d'âge, mais sans observer de différences de la fonction contractile ni du diamètre interne ventriculaire [86]. L'impact d'un régime obésogène maternel et/ou d'un régime obésogène post-sevrage sur la fonction cardiaque a été étudié chez des souris mâles âgées de 8 semaines. Dans les deux cas, une diminution de la FEVG et de la fraction de raccourcissement (FR) associée à une augmentation de la pression systolique et de la fibrose cardiaque a été observée. Les deux régimes ont induit une altération de la contractilité cardiaque mais seul le régime maternel a entraîné une hausse du ratio Myh7/Myh6, indicateur d'une hypertrophie cardiaque. De plus, une exposition à un régime riche en graisse pendant la gestation et la lactation prédisposent la descendance à développer une hypertrophie cardiaque, une accumulation de ROS, de l'apoptose, de la fibrose et des pathologies cardiovasculaires au cours de la vie adulte [130]. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de programmation périnataux nutritionnels menant à des dysfonctions cardiaques pourraient être distincts au cours de la période pré et postnatale. Cependant, ces deux modèles supportent le concept que la période périnatale est d'une importance majeure pour déterminer l'obésité des jeunes et adultes ainsi que le risque cardiovasculaire qui s'ensuit.

7. La SA augmente la susceptibilité myocardique aux stress pathologiques : lésions d'ischémie-reperfusion et médicaments cardiotoxiques

Alors que des dysfonctions de la structure cardiaque et vasculaire associées à une SA ont été décrites en condition physiologique, des études supplémentaires ont exploré la réponse cardiovasculaire à des situations pathologiques telles que l'ischémie-reperfusion (I-R). Là encore, une variabilité importante des résultats entre les études a été observée. Sur des cœurs isolés et perfusés en conditions basales, avant l'induction d'une ischémie, certains auteurs ont rapporté une contractilité cardiaque diminuée chez les rongeurs SA [79], alors que nous n'avons jamais observé de telles altérations initiales de la fonction ventriculaire gauche, chez

le rat ou la souris SA [60, 69, 80]. Après 30 min d'ischémie, une altération de la contractilité myocardique, caractérisée par une diminution de la dP/dt et de la pression développée ventriculaire gauche, a été rapportée dans des cœurs SA par rapport à leurs témoins [60, 70, 79]. La récupération du débit cardiaque était également significativement plus faible chez les animaux SA et associée à une libération accrue de la lactate déshydrogénase, un marqueur de lésion cellulaire [60]. Une augmentation du marqueur apoptotique caspase 8 a également été observée en réponse à la SA et à l'I-R [70]. L'altération d'importantes voies de signalisation a été signalée dans les cœurs ischémiques SA, comme l'activation de la phosphorylation de STAT-3, un composant de la voie SAFE, connu pour protéger des lésions d'I-R, ou la suractivation de SOCS-3, un inhibiteur potentiel de l'activation de STAT-3 [62, 69]. D'importantes altérations des protéines du métabolisme cardiaque ont été rapportées dans des cœurs de souris SA après une I-R *ex vivo*, notamment Akt2, pAkt/Akt1, pAkt/Akt2, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), pAMPK/AMPK, la protéine-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), IRS1, les protéines de liaison aux acides gras (FABP) et le CD36 [79]. Une récupération altérée après une I-R *ex vivo* était associée à une augmentation de la taille de l'infarctus dans le groupe SA par rapport au groupe NA [69, 80, 85], ainsi qu'à une augmentation du dépôt de collagène [79]. Des données récentes de notre équipe démontrent également une sensibilité accrue de longue durée (jusqu'à 12 mois suivant la SA) aux lésions d'ischémie-reperfusion myocardique induites par la ligature transitoire *in vivo* de l'artère coronaire interventriculaire antérieure gauche (IVA) chez la souris mâle (données non publiées).

Certains traitements anticancéreux, comme l'anthracycline doxorubicine (DOX) et des anticorps spécifiques comme le trastuzumab, sont connus pour induire des toxicités dose-dépendantes, qui agissent parfois de manière synergique délétère [131]. La DOX est bien connue pour être impliquée dans l'altération de l'expression des gènes cardiaques [132], entraînant la mort des cardiomyocytes et l'altération de la fonction cardiaque, en particulier chez des animaux obèses [133] ou chez des patients cancéreux en surpoids ou obèses [134]. Les souris SA traitées avec des doses toxiques sublétales de DOX ont montré une altération accrue de la fonction systolique ventriculaire gauche par rapport à leurs congénères témoins, alors que l'expression de la β -MHC augmentait de manière significative dans le tissu cardiaque

[135]. Ces résultats démontrent que les souris SA adultes étaient plus sensibles à l'insuffisance cardiaque systolique due à la cardiotoxicité DOX.

Dans l'ensemble, tous ces résultats suggèrent une plus grande sensibilité des cœurs SA aux conditions pathologiques associées au stress oxydant, telles que les lésions d'ischémie-reperfusion ou l'exposition à des médicaments anticancéreux cardiotoxiques.

Ainsi, la SA par réduction de la taille des portées est associée à de nombreuses altérations métaboliques et hormonales, pouvant entraîner des conséquences cardiovasculaires délétères à court et long terme (Figure 2).

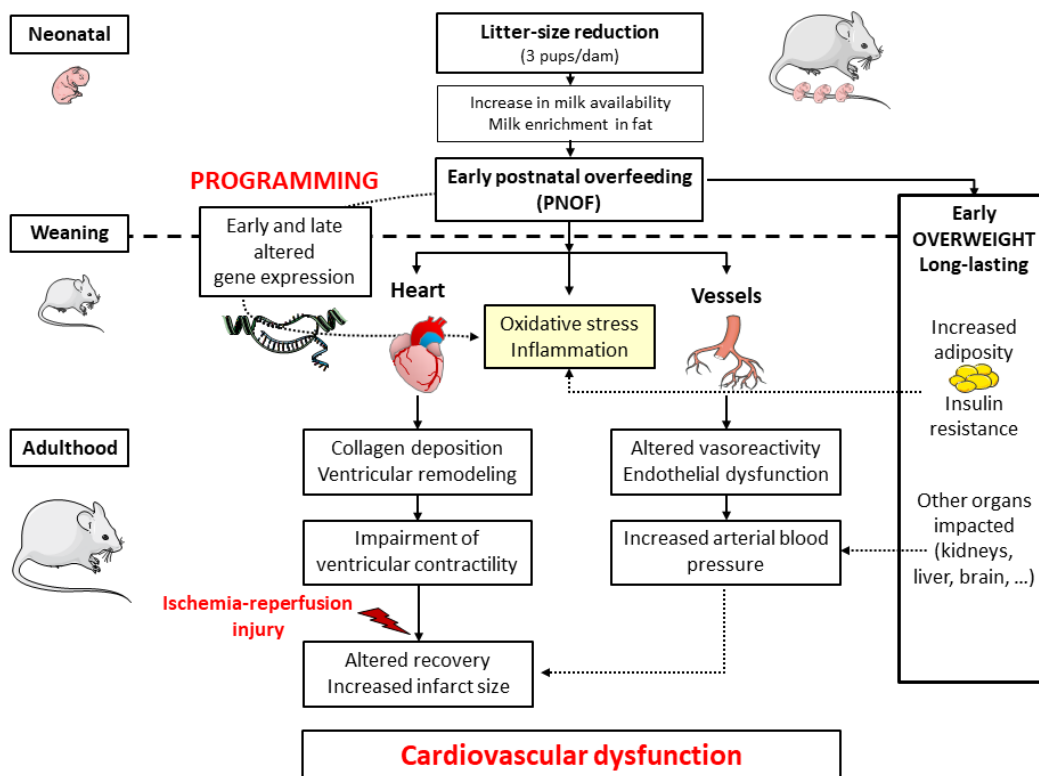


Figure 2 : Conséquences cardiaques et vasculaires de la programmation néonatale par suralimentation postnatale (SA) chez le rongeur [136].

La SA peut être induite par la réduction de la taille des portées, une situation qui augmente la consommation de lait pendant les 24 jours suivant la naissance et conduit à une obésité précoce et durable. De plus, l'expression de plusieurs gènes est modifiée dans de nombreux organes, entraînant des altérations structurelles et métaboliques. Les conséquences cardiovasculaires apparaissent plus tard dans la vie, notamment une vasoréactivité altérée et une augmentation de la pression artérielle,

un remodelage ventriculaire, un stress oxydant et une inflammation cardiaque, ainsi qu'une altération de la contractilité et de l'architecture cardiaque. Ensemble, ces modifications sont responsables d'une sensibilité accrue aux lésions d'ischémie-reperfusion et à une dysfonction cardiovasculaire à l'âge adulte.



Review

Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents

Marie Josse ¹, Eve Rigal ¹, Nathalie Rosenblatt-Velin ², Luc Rochette ¹, Marianne Zeller ¹, Charles Guenancia ¹ and Catherine Vergely ^{1,*}

- ¹ Research Team of Physiopathologie et Epidémiologie Cérébro-Cardiovasculaires (PEC2, EA 7460), Faculté des Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche Comté, 21000 Dijon, France; Marie_Josse01@etu.u-bourgogne.fr (M.J.); eve.rigal@u-bourgogne.fr (E.R.); luc.rochette@u-bourgogne.fr (L.R.); marianne.zeller@u-bourgogne.fr (M.Z.); charles.guenancia@chu-dijon.fr (C.G.)
- ² Division of Angiology, Heart and Vessel Department, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, 1005 Lausanne, Switzerland; nathalie.rosenblatt@chuv.ch
- * Correspondence: cvergely@u-bourgogne.fr; Tel.: +33-380-393-460



Received: 23 November 2020; Accepted: 9 December 2020; Published: 11 December 2020

Abstract: Nutritional environment in the perinatal period has a great influence on health and diseases in adulthood. In rodents, litter size reduction reproduces the effects of postnatal overnutrition in infants and reveals that postnatal overfeeding (PNOF) not only permanently increases body weight but also affects the cardiovascular function in the short- and long-term. In addition to increased adiposity, the metabolic status of PNOF rodents is altered, with increased plasma insulin and leptin levels, associated with resistance to these hormones, changed profiles and levels of circulating lipids. PNOF animals present elevated arterial blood pressure with altered vascular responsiveness to vasoactive substances. The hearts of overfed rodents exhibit hypertrophy and elevated collagen content. PNOF also induces a disturbance of cardiac mitochondrial respiration and produces an imbalance between oxidants and antioxidants. A modification of the expression of crucial genes and epigenetic alterations is reported in hearts of PNOF animals. In vivo, a decreased ventricular contractile function is observed during adulthood in PNOF hearts. All these alterations ultimately lead to an increased sensitivity to cardiac pathologic challenges such as ischemia-reperfusion injury. Nevertheless, caloric restriction and physical exercise were shown to improve PNOF-induced cardiac dysfunction and metabolic abnormalities, drawing a path to the potential therapeutic correction of early nutritional programming.

Keywords: perinatal programming; postnatal overfeeding; rodents; heart; arteries; ischemia; cardiovascular dysfunction

1. Introduction

Early growth trajectories [1] are essential to determine maturity metabolism and health in adulthood. Foetal exposure to toxic components, endocrine disruptors and to under- or over-nutrition are key determinants in the development of metabolic diseases later in life and are all related to the concept of developmental programming [2]. This theory suggests that hormonal or nutritional factors in the neonatal period can lead to major changes in gene expression, initially intended to adapt the organism to changes in its environment. However, these changes may also be inappropriate and predispose the individual to develop organ malfunction and diseases if the postnatal environment does not match with the orientation of genomic expression [3]. A recent study reported that, during the period 2006–2016, 17.9% of European children aged 2–7 were overweight or obese [4]. As it is now perfectly recognized, obesity and being overweight are predisposing factors for metabolic and cardiovascular diseases, and it is therefore essential to pay great attention to the consequences of unsuitable diet during childhood and to overnutrition, which may induce an increased risk of developing non-communicable diseases and late onset metabolic disorders [5].

In rodents, postnatal overfeeding (PNOF), induced by litter size reduction after birth, has been shown to induce a significant weight gain at weaning (30% increase) that remains in adult life, although at a lower level (15%), and is associated with increased adiposity and altered metabolic parameters [6]. Indeed, litter size reduction leads to increased availability of breast milk for pups [7,8], and some studies have also shown that milk from small litter dams was high in energetic value with an enrichment in triglycerides [7,9] but not proteins [10], in comparison to control dams. Thus, PNOF represents a relevant experimental model to study the long-term impact of overnutrition in the early stages of life [11,12]. In fact, in most mammals, the development of some organs is not completed at birth and continues in the immediate neonatal life. In contrast, the heart was for a long time considered to be a post-mitotic organ with a definite number of cardiomyocytes at birth, which were believed to be unable to proliferate or regenerate. This observation was challenged when studies demonstrated, in humans and animals, that a low regeneration rate of cardiomyocytes was still possible [13–17]. Thus, stimuli induced by neonatal malnutrition may disturb cell proliferation and/or differentiation, and affect, in the short- or long-term, the heart and vascular function.

In this review, we explore how PNOF impacts the cardiovascular system at early life stages and later in adulthood, and the potential underlying mechanisms (Figure 1). All data presented in the article are summarized in Table 1.

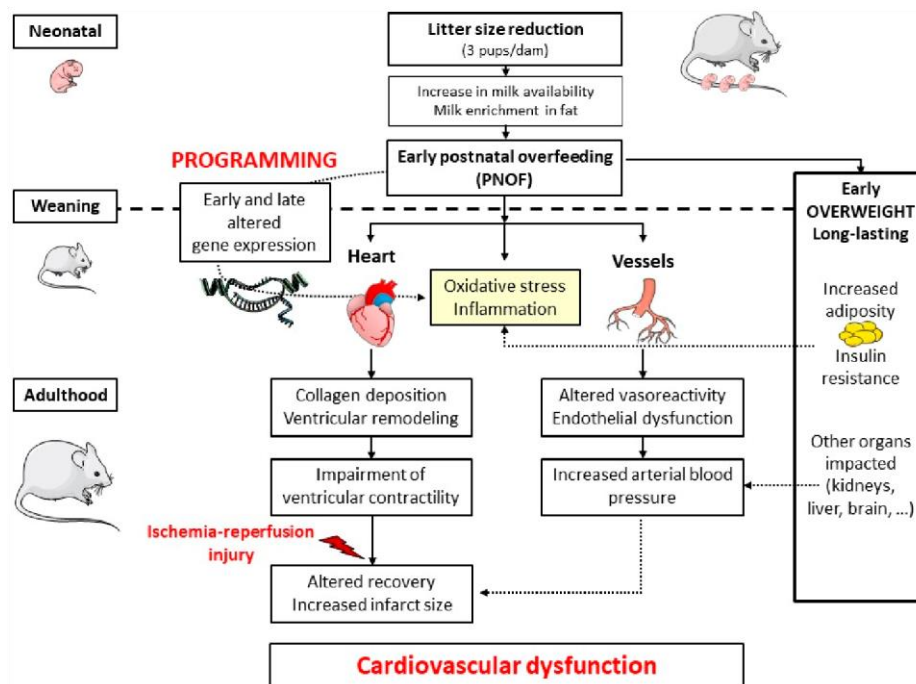


Figure 1. Cardiac and vascular consequences of neonatal programming by postnatal overfeeding (PNOF) in rodents. PNOF can be induced by litter size reduction, a situation that increases milk consumption during the 24 days after birth and leads to early and long-lasting obesity. Additionally, the expression of several genes is modified in many organs, leading to structural and metabolic alterations. Cardiovascular consequences appear later in life, including altered vasoreactivity and increased arterial blood pressure, ventricular remodelling, cardiac oxidative stress and inflammation, and impaired cardiac contractility and architecture. Altogether, these modifications are responsible for an increased sensitivity to ischemia-reperfusion injury and cardiovascular dysfunction in adulthood.

Table 1. Summary of early ([E]: birth to 1-month-old) and long-term ([L]: 1 to 12-months-old) cardiovascular and metabolic alterations induced by the postnatal overfeeding of male rodents. ↑: significantly increased compared to control; ↓: significantly decreased compared to control; =: similar to control.

SPECIES: Strain	[E]: Early Alterations (Birth to 1-Month-Old) or [L]: Long-Term Alterations (1 to 12-Months-Old)	Ref.
RATS: Sprague Dawley	[L]: ↑ blood pressure Glomerulosclerosis Renal dysfunction	[18]
RATS: Sprague Dawley	[L]: ↑ blood pressure Renal cell apoptosis and inflammation	[19]
RATS: Sprague Dawley	[L]: ↑ plasma leptin levels ↑ susceptibility to ex vivo ischemia-reperfusion ↑ apoptotic markers	[20]
RATS: Sprague Dawley	[E]: ↑ plasma glucose/insulin/leptin/total lipids/cholesterol levels ↓ HDL cholesterol ↓ vasodilation to acetylcholine, SNP and insulin Cardiac and vascular insulin resistance	[21]

Pro-inflammatory and pro oxidant state		
RATS: Wistar	[E]: ↑ plasma glucose/insulin/leptin levels Alteration of cardiac insulin and leptin pathways	[22]
RATS: Wistar	[E]: ↑ plasma total cholesterol/triglycerides levels Left ventricular hypertrophy ↓ intramyocardial vessel density	[23]
RATS: Wistar	[L]: ↑ plasma insulin/leptin levels = glucose levels Glucose intolerance ↑ glucose-stimulated insulin secretion GLUT2 ↑ insulin content in pancreatic islets	[7]
RATS: Wistar	[L]: ↑ blood glucose/plasma insulin/leptin levels = triglycerides/cholesterol levels = vasoreactivity to acetylcholine/SNP/phenylephrine ↑ collagen deposit ↑ susceptibility to ex vivo ischemia-reperfusion Alteration of oxidative balance	[6]
RATS: Wistar	[L]: ↑ blood pressure ↑ aortic thickness ↓ aortic elastin integrity ↑ aortic MMP-2 expression	[24]
RATS: Wistar	[E]: ↑ plasma glucose/cholesterol/triglycerides levels Alteration of mitochondrial function Alteration of oxidative balance [L]: ↑ plasma glucose/triglycerides levels Alteration of mitochondrial function Alteration of oxidative balance	[25]
RATS: Wistar	[L]: ↑ blood glucose Glucose and insulin intolerance	[26]
RATS: Wistar	[L]: ↑ plasma insulin/triglycerides levels = glucose/HDL and LDL cholesterol levels ↑ blood pressure ↑ aortic collagen content ↓ elastic fiber density	[27]
RATS: Wistar	[E]: ↑ glomerular size and cellularity ↑ renal collagen content Alteration of oxidative balance	[28]

Table 1. Cont.

SPECIES: Strain	[E]: Early Alterations (Birth to 1-Month-Old) or [L]: Long-Term Alterations (1 to 12-Months-Old)	Ref.
RATS: Wistar	[L]: ↑ plasma triglycerides ↓ HDL cholesterol ↓ vasodilation to acetylcholine ↑ vasoconstriction to phenylephrine ↑ blood pressure Cardiac hypertrophy and fibrosis = cardiac contractile function Alteration of oxidative balance	[29]

RATS: Wistar	[L]: ↑ blood pressure Cardiomyocyte hypertrophy Cardiac fibrosis	[30]
RATS: Wistar	[L]: ↑ blood pressure = cardiac contractile function Cardiac hypertrophy [E]: Alteration of cardiac gene expression [L]: ↑ plasma cholesterol/insulin/leptin levels	[31]
MICE: C57BL/6	↑ blood pressure ↓ cardiac contractile function ↑ collagen deposit ↑ susceptibility to ex vivo ischemia-reperfusion Alteration of myocardial oxidative balance	[32]
MICE: C57BL/6	[L]: ↑ plasma insulin/leptin levels = glucose levels Glucose and insulin intolerance ↓ cardiac contractile function ↑ collagen deposit ↑ susceptibility to ex vivo ischemia-reperfusion ↑ cardiac oxidative stress	[12]
MICE: C57BL/6	[L]: ↑ plasma IL-6 levels Alteration of cardiac inflammasome NLRP3 and insulin pathways	[33]
MICE: C57BL/6	[L]: ↑ infarct size after in vivo ischemia-reperfusion ↓ cardioprotective pathways [E]: ↑ senescence pathways in kidney	Unpublished data [34]
MICE: C57BL/6	[L]: ↑ blood pressure ↑ glomerular number	[35]
MICE: Swiss	[L]: ↑ plasma insulin levels = glucose/triglycerides/cholesterol levels Glucose intolerance Alteration of cardiac insulin pathway ↑ heart weight	[36]
MICE: Swiss	[L]: ↑ plasma glucose/insulin/leptin levels ↑ collagen deposit Cardiac hypertrophy ↑ susceptibility to ex vivo ischemia-reperfusion Alteration of insulin and fatty acid pathways	[37]
MICE: Swiss	[E]: ↑ plasma glucose/insulin/triglycerides/total cholesterol levels Alteration of cardiac insulin pathways Cardiac hypertrophy and fibrosis Alteration of cardiac metabolism	[38]

2. PNOF is Associated with Systemic and Cardiovascular Metabolic Alterations

As observed earlier by Plagemann [39–42], rodents subjected to PNOF have a significantly higher body weight than controls at weaning, which persists through growth and maturation. This permanent increase in body weight is not related to a general enhancement of body growth including bones, muscles and organs, but rather to increased adiposity [43]. Whole body composition analysis with magnetic resonance imaging (MRI) demonstrated that PNOF mice have more body fat mass and less

lean mass [32]. Deeper analyses of fat location showed that PNOF rats have an increase in both subcutaneous and visceral fat (epididymal, retroperitoneal, perirenal, mesenteric) at weaning [20] and later [7,44,45], with an increased adipocyte surface [46–48]. The white adipose tissue of PNOF rodents also displays significant differences in the expression of proteins involved in insulin responsiveness, such as a downregulation of insulin receptor substrate-1, protein kinase B (Akt2) and glucose transporter 4 [49] and in the adipose glucocorticoid metabolism [46,47,50,51]. An overexpression of proinflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor (TNF)- α , TNF-receptor 1, interleukin-6 and resistin, is also observed in the white adipose tissue of PNOF rats [50]. Recent data also suggest that PNOF may impair the differentiation potential of subcutaneous adipose mesenchymal stem cells, which may be involved in the increased adiposity observed in neonatally overfed mice [52]. This disequilibrium of fat proportion is associated with other endocrine and metabolic changes. A significant increase in insulin plasma levels was reported in overfed animals, in both rats and mice, young and adult [6,22,32,37,46,47,53]. Such an increase is believed to reflect insulin resistance [12], an hypothesis corroborated by a higher fasting glucose level in overfed animals [6,22] but also impaired glucose tolerance [7,9,22,26,54] and increased insulin secretion in response to glucose [7,39]. Plasma leptin levels were also shown to be higher in PNOF animals [7,21,22,37,46,55], an observation that could easily be explained by increased adiposity, since leptin production is released from adipocytes and the gene expression of leptin is increased in the white and brown adipose tissue of PNOF rats [56]. When adiposity is increased, circulating lipid levels are also disturbed in PNOF rodents. Significant increases in free fatty acids, triglycerides and cholesterol content associated with decreased HDL-cholesterol levels were described in most studies [21,23,25,29,46,49], while some others did not detect any lipid level variations [6]. These discrepancies may be related to distinct strains, ages and pathophysiological conditions when lipid profiles were analysed. The modification of the lipid profile and adipose tissue content may be responsible for a pro-inflammatory state; indeed, adipose tissue is able to release adipocytokines and some of them have been described to be involved in the development of cardiovascular diseases [57,58].

Analyses of cardiovascular metabolism also demonstrated an alteration of insulin signalling in the myocardium of overfed rats [21] and mice, confirmed by decreased insulin receptor (IR)- β and IR substrate-1 (IRS) phosphorylation [36]. These impairments appear very early, since they are present at weaning in PNOF mice hearts with decreased expression of IR β , pTyr-IRS1, phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), type-4 glucose transporters (GLUT4) and pAkt/Akt, and increased expression of GLUT1 and pAMPK α /AMPK α content [38]. The immunofluorescence of glucose transporter 4 (GLUT-4) location in cardiomyocytes also showed a decreased translocation of GLUT-4 to the plasma membrane [21]. However, another study observed that GLUT-4 protein expression was increased in overfed rats [22]. Indeed, experiments on isolated aorta and hearts showed decreased responsiveness to insulin due to under-activation of the PI3K/Akt pathway and over-activation of the MAPK cascade, respectively [53]. In both myocardium and arteries, insulin resistance may be related to a pro-inflammatory state, since levels of pro-inflammatory cytokines and markers of a pro-oxidant state were significantly increased [21].

In the juvenile hearts of post-weaning PNOF mice, the activities of lactate dehydrogenase and citrate synthase were increased, accompanied by enhanced carbohydrate oxidation, lower mRNA expression of carnitine palmitoyl-transferase I (CPT1) and peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α), and increased uncoupling protein-2 (UCP2) expression, indicating a switch in cardiac metabolism preference towards carbohydrates [38].

3. PNOF Affects Blood Pressure and Vascular Function

In vivo measurements of blood pressure revealed a moderate but significant 10–20 mmHg increase in both systolic and diastolic blood pressure in adult male rats and mice

[11,19,24,29,31,56,59]. Blood pressure is highly dependent on cardiac flow and vascular resistance. Analyses of vascular reactivity in arteries collected from PNOF rodents showed differing results. On isolated aortic rings of adult overfed rats, some authors demonstrated a decreased vasorelaxation in response to acetylcholine (Ach) but not to sodium nitroprusside (SNP) [29], which could suggest impaired endothelial function [60]. Insulin exerts an endothelial-dependent vasodilatory effect through increased nitric oxide (NO) production and availability in endothelial cells [61]. Experiments on vascular reactivity pointed out that overfed rats have a decreased vasodilatory capacity in response to insulin due to a reduced phosphorylation and activation of the enzyme eNOS involved in NO production [21]. The same other authors showed an impaired response to both Ach and SNP [21], meaning that both endothelial and smooth muscle cell responses were altered. Additionally, contractile response to phenylephrine was also shown to be increased in aortic segments from overfed rats [29], suggesting an enhanced response to α -adrenergic-dependent vasoconstrictive stimuli. However, we failed to detect differences in vascular reactivity between control and overfed animals [6]. Altogether, these results indicate that vascular reactivity can be altered by PNOF, but might be influenced by strains, breeding and the maturity stages of animal models.

In addition, vascular morphological alterations can be observed in adult overfed rats, with increased collagen content and lower elastic fibre density [27], aortic wall thickening in parallel with reduced elastin integrity and increased blood pressure [24]. Higher aortic and plasma expression and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were evidenced, and the aortic MMP-2 activity was also shown to be positively correlated with aortic wall thickness [24]. These authors suggest that aortic MMP-2 upregulation could be explained by metabolic disorders such as elevated plasma insulin and/or lipid levels, considering that such disorders are usually observed in overfed animals as indicated previously [62].

Other parameters involved in blood pressure regulation may also be affected by PNOF. For instance, impaired renal function is also a strong determinant in the development of cardiovascular diseases. Many studies reported that PNOF rats developed systemic hypertension associated with renal dysfunction in adulthood [18,63]. Impaired kidney function and structure were observed in both young [28] and adult [18,35,64] overfed rats, with an initial increased glomerular endowment, followed by progressive glomerulosclerosis, accelerated reduction in nephron number, cortical cell apoptosis [19], altered glomerular filtration rate [18] and higher senescence in kidneys with aging [35]. Moreover, the intra-renal renin angiotensin system is disturbed, with an increased expression of renin and angiotensin II type (AT) 2 receptor in overfed rats [59,65]. Considering the major importance of the renin angiotensin aldosterone system in regulating blood pressure, these modifications may have an impact on arterial blood pressure levels in PNOF rodents.

Additionally, some authors have also shown that PNOF was able to increase the capacity of the adrenal gland to secrete catecholamines [66] but also corticosterone [46,47]. Regarding the pro-hypertensive effects of these adrenal hormones, a humoral dysregulation could also be involved in PNOF-driven hypertension.

Thus, not only altered vascular reactivity and structure, but also PNOF-induced renal and humoral dysfunction might play a role in the development of increased arterial blood pressure.

4. PNOF Affects Heart Structure, Function, and Adaptation to Pathological Situations

4.1. PNOF Impairs the Architecture and Structure of the Heart

Metabolic alterations induced by PNOF may also change the structure of the heart by modulating cardiac cell fate. In fact, PNOF occurs at a critical stage of heart formation. Indeed, at birth, mammalian hearts switch from a low oxygen environment to 20% oxygen. This leads to a change of metabolism from anaerobic glycolysis to oxygen-dependent mitochondrial oxidative phosphorylation [67]. This

metabolism switch is required for body and organ growth. Concomitantly, hearts progressively lose their capacity to regenerate. Cardiomyocytes exit from the cell cycle, stop their proliferation and undergo hypertrophy and architecture maturation [68]. Fibroblasts become larger, with a reduced cell turnover compared to foetal fibroblasts [69]. Furthermore, after birth the composition and stiffness of the extracellular matrix (ECM) change. Indeed, adult heart ECM is enriched in collagen 1 and laminin, with reduced levels of fibronectin and periostin [70]. Altogether, these results suggest that metabolic changes will directly affect the cardiac cells and thus the heart structure. This was reported in several overfeeding animal models such as zebrafish, rodents and sheep [29,30,71,72]. Numerous studies reported impaired cardiac morphometry and hypertrophic protein marker expression.

At the organ level, PNOF, which is associated with cardiac hypertrophy at weaning and/or in adults, is characterized by an increase in cardiomyocytes' diameter or in heart mass normalized to tibia length [23,29,36,37]. Moreover, PNOF rat hearts have left ventricular hypertrophy with an increased area of cardiomyocytes and a decreased vessel density [23]. However, myocardial hypertrophy is not observed in all studies [6,32,56]. Metabolic changes may directly modulate cardiomyocyte fate, and important cellular mechanisms will be impaired depending on the stage of heart development, such as cardiomyocyte cell proliferation, maturation, or survival. For example, during development, glycolytic metabolism was shown to be associated with cardiomyocyte cell proliferation [8], and glucose inhibits cardiomyocyte maturation [8,73]. In the same line, the switch from carbohydrates to fatty acid metabolism increases cell maturation and blocks cardiomyocyte proliferation [74]. In contrast, inhibiting fatty acid metabolism stimulates cardiomyocyte proliferation in postnatal hearts, which leads to the extension of the postnatal cardiomyocyte proliferative window [75,76]. An excess amount of fatty acids was also reported to induce cell death in H9C2 cardiomyoblasts (via a ferroptosis mechanism) [54,77] or endothelial dysfunction (via increased oxidative stress, inflammation, mitochondrial dysfunction and apoptosis) [78]. Therefore, early changes in circulating lipids or other metabolic substrate levels observed in PNOF animals may directly impact cardiomyocytes' ability to proliferate in the immediate postnatal period and could have a long-term impact on cardiac hypertrophy and myocardial susceptibility to pathological stressors.

Finally, histological analysis with picrosirius red showed that adult male overfed mice have an increased collagen deposition in the left ventricle in non-pathological conditions [32,37,79]. Adult overfed rats also present higher interstitial and perivascular collagen density [29], and this higher fibrosis content is combined with greater expression and activity of the matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) [6]. Whether this reflects a direct effect of PNOF on cardiac fibroblasts remains to be established. However, such ventricular structural changes linked to higher collagen deposition might be responsible for modifications of the ventricular architecture and the alteration of contractile function [29]. Moreover, an increase in the mRNA expression of atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP) in the hearts of PNOF mice strongly suggests the activation of pro-hypertrophic pathways [37].

4.2. PNOF Induces Short- and Long-Term Alterations of Gene Expression in the Heart

In order to explain the long-term metabolic and cardiovascular alterations induced by neonatal overnutrition, foetal programming through gene expression modifications has been suggested. It has already been observed that obesity during pregnancy increases the risk for the offspring to develop cardiovascular diseases in humans and animals [80]. The expression alteration of crucial genes was reported, such as upregulation of *Myh7*, coding for the β -myosin heavy chain (β -MHC), brain natriuretic peptide (BNP) or *Gata-4* during foetal development, potentially leading to increased cardiovascular risk. Similarly, a comparison of gene expression between the hearts of over and normally fed mice at weaning showed that the expression of not less than 822 genes was modified after PNOF [32]. After deeper analyses, results were restricted to 102 over- or under-expressed genes,

and among them, 12% of the over-expressed genes were structural encoding genes mostly for collagen.

Gene expression is also regulated by epigenetic modifications through histone acetylation, DNA methylation or RNA-based mechanisms, and early postnatal nutrition may program obesity and cardiac risk via epigenetic mechanisms [81]. In infants, the duration of breastfeeding has an impact on metabolic epigenome [82]. In PNOF rats, Plagemann was the first to report an increased hypothalamic methylation in the promoter of the anorexigenic proopiomelanocortin gene [53], demonstrating epigenetic mal-programming of brain satiety pathways. Other groups have described epigenetic changes in skeletal muscle [83], the liver [84] or the pancreas [85] associated with insulin resistance in PNOF. In the heart, a study analysed the impact of maternal exposure to high fat diet on epigenetic markers of the offspring in rats. They reported alterations of DNA and histone methylation leading to the activation of pro-hypertrophic and pro-fibrotic genes in the heart, which might have a role in the PNOF-induced cardiovascular risk increase [86]. Moreover, an alteration of the NLRP3 inflammasome pathway in the myocardium was noted [33]. Its signalling is regulated by the micro-RNA miR-193b, which is also impaired by PNOF. The involvement of altered micro-RNA regulation has been evidenced in the cardiac health of offspring exposed to maternal high-fat diet [87], and this could play an important role in the deleterious effects of PNOF.

4.3. PNOF is Associated with Increased Oxidative Stress and Mitochondrial Impairment in the Heart

Mitochondria, organelles that are particularly abundant in cardiac cells, play a central role in cardiomyocyte function and in the production of reactive oxygen species. Therefore, mitochondrial dysfunction may lead to excessive free radical production and to the impairment of ventricular bioenergetics. In the post-weaning hearts of PNOF mice, ultrastructural analysis demonstrated mild mitochondrial damage without alterations in oxidative phosphorylation complexes [38]. A study was conducted to explore mitochondrial function under physiological or stressful conditions such as anoxia/reoxygenation (A-R) in the hearts of rats subjected to PNOF [25]. They observed a dysregulation of mitochondrial respiratory capacity in young and adult animals, especially after stimulation with ADP (state 3). Although A-R induced a decrease in respiratory parameters in mitochondrial cardiomyocytes, it did not worsen mitochondrial function in overfed rats in comparison to control rats.

In cardiomyocytes, reactive oxygen species (ROS) are mainly produced by complexes I and III of the respiratory chain, thus, mitochondrial dysfunction may lead to an increased production of ROS. An imbalance between ROS production and the activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, may induce oxidative stress and has been described in adult overfed hearts [6,11,29,32]. The direct evaluation of the production of reactive oxygen and nitrogen species with electron paramagnetic resonance spectroscopy [88] has demonstrated increased production of these species in the hearts of PNOF rats and mice [12,32]. Additionally, an increase in markers of oxidative lipid damage, 4-hydroxynonenal, has been observed in juvenile PNOF mice hearts [38]. Oxidative stress has been shown to activate hypertrophic and pro-inflammatory pathways and thus could be, in part, responsible for cardiac hypertrophy and higher collagen deposition, as previously mentioned [89]. Indeed, inflammation and immune cells are crucial in the initiation, development, and progression to chronicity of several cardiovascular diseases, such as hypertension [90], atherosclerosis [91] or pathologies affecting cardiac injury and repair [92] and involve the innate and adaptive immune responses [93,94]. Again, these biochemical changes associated with higher inflammatory status and oxidative stress might be involved in the alterations of cardiac contractile function and predispose the heart to a higher sensitivity to ischemic or toxic injuries.

4.4. PNOF Alters Cardiac Function In Vivo

Echocardiographic analysis enables us to study how PNOF affects the global cardiac function in vivo in young and adult overfed animals. Interestingly, 3-month-old overfed male mice initially display a significantly improved left ventricular ejection fraction (LVEF) after PNOF in comparison to control mice. However, it gradually decreases over time, resulting in a significant reduction in LVEF at 7 months, which is associated with an increased left ventricular internal diameter [12,32]. Another study in rats demonstrated a significant increase in left ventricular posterior wall and interventricular septum thickness at 120-days-old, but no differences in ventricular internal diameter or contractile function [29]. The impact of an obesogenic maternal diet and/or a post-weaning obesogenic diet on cardiac function was evaluated in 8-week-old male mice. In either case, a decrease in LVEF and in left ventricular fractional shortening (LVFS), associated with an increase in systolic blood pressure and heart fibrosis, was observed. Both diets induced the alteration of cardiac contractility, but only maternal diet led to a rise of the Myh7/Myh6 ratio, which represents an indicator of cardiac hypertrophy. Moreover, dietary fat exposure during gestation and lactation predisposed the offspring to develop cardiac hypertrophy, ROS accumulation, apoptosis, fibrosis and cardiovascular diseases in adult life [95]. These results suggest that perinatal nutritional programming mechanisms leading to cardiac dysfunction might be distinct in the pre and postnatal period. However, both models support the concept that perinatal periods are of major importance to determine young- and adult-onset obesity and subsequent cardiovascular risk.

Surprisingly, cardiac alterations were shown to be gender-dependant. Litter size reduction does not affect the cardiovascular function of Wistar female rats at 150 days of life as it is described for males, who present myocardial hypertrophy and left ventricle structural remodelling [31]. Oestrogen might act directly on cardiac myocytes by increasing atrial natriuretic peptide, which may decrease apoptosis/necrosis and lead to mitigating the cardiac hypertrophy [55]. However, more experimental data are needed considering the lack of information regarding PNOF-induced cardiac alterations in female rodents.

4.5. PNOF Increases Myocardial Susceptibility to Pathological Stresses: Ischemia-Reperfusion Injury and Cardiotoxic Drugs

Since structural cardiac and vascular dysfunctions were described in physiological conditions, additional studies have explored the cardiovascular response to pathological situations such as ischemia-reperfusion (I-R). Again, an important variability in the findings between studies was observed. Before the induction of ischemia in hearts isolated and perfused in basal conditions, some authors reported that hearts from PNOF rodents had a decreased cardiac contractility [37], while we never observed such initial alterations of left ventricular function neither in PNOF rats nor in mice [6,12,32]. After 30 min of ischemia, an impairment of myocardial contractility, characterized by a decrease in dP/dt and left ventricular developed pressure, was reported in overfed hearts [6,20,37] in comparison to their control littermates. Cardiac output recovery was also significantly lower in overfed animals and associated with the increased release of lactate dehydrogenase, a marker of cell injury [6]. An increase in an apoptotic marker, caspase 8, in response to PNOF and I-R was also observed [20]. The alteration of important signalling pathways was also reported in overfed ischemic hearts, such as the phosphorylation activation of STAT-3, one component of the SAFE pathway, which is known to be protective against I-R injury, or the overactivation of SOCS-3, a potential inhibitor of STAT-3 activation [32,44]. Significant alterations in heart metabolism proteins, including Akt2, pAkt/Akt1, pAkt/Akt2, AMP-activated protein kinase (AMPK), pAMPK/AMPK, protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), IRS1, fatty-acid-binding proteins (FABP) and cluster differentiation 36 (CD36) were also reported in PNOF mice hearts after ex vivo ischemia-reperfusion injury [37].

Impaired recovery after ex vivo I-R was associated with an increased infarct size in the overfed group in comparison to its control [12,25,32], as well as an increased collagen deposition [37]. Recent data from our teams also demonstrate a long lasting (up to 12 months after PNOF) increased sensitivity to myocardial ischemia-reperfusion injury induced by in vivo transient ligation of the left anterior descending (LAD) coronary artery in male mice (unpublished data [34]). Once again, males and females did not present the same cardiac sensitivity to I-R, with PNOF females being less affected by myocardial ischemia-reperfusion injury (unpublished data). More investigations are therefore needed to explain the mechanisms potentially involved in the alteration of cardioprotective pathways and in sexual dimorphism in PNOF mice.

Some anticancer drugs, such as anthracycline doxorubicin (DOX) and specific antibodies like trastuzumab, are known to induce dose dependent toxicities, which sometimes act in a synergic deleterious manner [96]. DOX is well known to be involved in the alteration of cardiac gene expression [97], leading to cardiomyocyte death and impaired cardiac function especially in obese animals [98] or in overweight or obese cancer patients [99]. PNOF mice treated with sub-lethal mild toxic doses of DOX showed enhanced impairment of left ventricular systolic function than control littermates, whereas the expression of β -MHC increased significantly in cardiac tissue [100]. These results demonstrate that adult PNOF mice were more sensitive to cardiac systolic impairment due to DOX cardiotoxicity.

Altogether, these findings suggest a greater sensitivity of PNOF hearts to stressful pathological conditions associated with oxidative stress, such as ischemia-reperfusion injury or exposition to cardiotoxic anticancer drugs.

5. Openings

As developed in this review, PNOF negatively impacts cardiovascular function. Other nutritionally challenging situations, such as peri- and/or postnatal undernutrition, may also have deleterious effects on the heart's structure and functioning [101–103]. The alteration of some parameters persists over time and can even worsen. Nevertheless, some of the functional consequences of PNOF can be prevented or reversed. In adulthood, one month of 20% food restriction in adult male mice improved insulin plasma level, ischemia-reperfusion sensitivity and cardiac function and decreased oxidative stress [12]. This calorie restriction was also able to reduce PNOF-induced liver senescence [104] and other hepatic disorders such as steatosis and oxidative stress [105]. Furthermore, the early administration of metformin, a drug commonly used as a type 2 diabetes treatment, prevented PNOF-induced metabolic disorders such as hyperinsulinemia and improved pancreatic function in postnatal overfed rats [106]. Another study also demonstrated that a training period of 8 weeks was beneficial for improving the cardiorespiratory function represented by VO_2 max as well as glucose and insulin sensitivity in rats subjected to PNOF, regardless of the training intensity [26].

Finally, it is noteworthy that, in this review, we mainly focused on the PNOF cardiovascular effects on male offspring. As briefly mentioned, PNOF may affect female rodents in a very different manner [31], and cardiometabolic disorders are sex-dependent in several aspects [107]; therefore, more data would be necessary to determine the distinct PNOF-induced consequences on both genders.

6. Conclusions

Postnatal overfeeding by litter size reduction is associated with numerous metabolic and hormonal alterations, which may lead to long-term deleterious cardiovascular consequences, such as arterial blood pressure elevation, ventricular remodelling, cardiac dysfunction and increased

sensibility to ischemia-reperfusion. Indeed, litter size strongly influences adult metabolism and organ function in adults [108], and scientific articles that utilize rodent models for obesity and metabolic research should include more detailed information on the litter sizes. The results may somehow differ by number of pups per dam, strain type, diet composition or age of animals during the experiments; however, they all confirm that the nutritional state in the immediate postnatal period is crucial for proper myocardial and vascular structuration, metabolism fate and appropriate response to pathological conditions.

Author Contributions: Writing—original draft preparation: M.J., C.V.; Writing—review and editing: E.R., L.R., M.Z., C.G., N.R.-V.; Validation: C.V., N.R.-V.; Supervision: C.V.; Funding acquisition: C.V., N.R.-V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Association de Cardiologie de Bourgogne, and by grants from the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté, the French Ministry of Research and Education, the University of Burgundy, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) and the Fondation de France.

Conflicts of Interest: The authors report no relationships that could be construed as a conflict of interest.

References

1. Haschke, F.; Binder, C.; Huber-Dangl, M.; Haiden, N. Early-Life Nutrition, Growth Trajectories, and Long-Term Outcome. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.* **2019**, *90*, 107–120.
2. Langley-Evans, S.C. Developmental programming of health and disease. *Proc. Nutr. Soc.* **2006**, *65*, 97–105. [[CrossRef](#)]
3. Plagemann, A.; Harder, T.; Schellong, K.; Schulz, S.; Stupin, J.H. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *26*, 641–653. [[CrossRef](#)]
4. Garrido-Miguel, M.; Oliveira, A.; Cavero-Redondo, I.; Alvarez-Bueno, C.; Pozuelo-Carrascosa, D.P.; Soriano-Cano, A.; Martinez-Vizcaino, V. Prevalence of Overweight and Obesity among European Preschool Children: A Systematic Review and Meta-Regression by Food Group Consumption. *Nutrients* **2019**, *11*, 1698. [[CrossRef](#)]
5. Larque, E.; Labayen, I.; Flodmark, C.E.; Lissau, I.; Czernin, S.; Moreno, L.A.; Pietrobelli, A.; Widhalm, K. From conception to infancy—early risk factors for childhood obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 456–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Habbout, A.; Delemeasure, S.; Goirand, F.; Guillaud, J.C.; Chabod, F.; Sediki, M.; Rochette, L.; Vergely, C. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie* **2012**, *94*, 117–124. [[CrossRef](#)]
7. Cunha, A.C.; Pereira, R.O.; Pereira, M.J.; Soares Vde, M.; Martins, M.R.; Teixeira, M.T.; Souza, E.P.; Moura, A.S. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2. *J. Nutr. Biochem.* **2009**, *20*, 435–442. [[CrossRef](#)]
8. Nakano, H.; Minami, I.; Braas, D.; Pappoe, H.; Wu, X.; Sagadevan, A.; Vergnes, L.; Fu, K.; Morselli, M.; Dunham, C.; et al. Glucose inhibits cardiac muscle maturation through nucleotide biosynthesis. *eLife* **2017**, *6*, e29330. [[CrossRef](#)]
9. Xavier, J.L.P.; Scomparin, D.X.; Pontes, C.C.; Ribeiro, P.R.; Cordeiro, M.M.; Marcondes, J.A.; Mendonca, F.O.; Silva, M.T.D.; Oliveira, F.B.; Franco, G.C.N.; et al. Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2019**, *91*, e20170971. [[CrossRef](#)]
10. Sefcikova, Z.; Bujnakova, D.; Racek, L.; Kmet, V.; Mozes, S. Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. *Physiol. Res.* **2011**, *60*, 337–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Habbout, A.; Li, N.; Rochette, L.; Vergely, C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *J. Nutr.* **2013**, *143*, 553–562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Li, N.; Guenancia, C.; Rigal, E.; Hachet, O.; Chollet, P.; Desmoulins, L.; Leloup, C.; Rochette, L.; Vergely, C. Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Carvalho, A.B.; de Carvalho, A.C. Heart regeneration: Past, present and future. *World J. Cardiol.* **2010**, *2*, 107–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Porrello, E.R.; Mahmoud, A.I.; Simpson, E.; Hill, J.A.; Richardson, J.A.; Olson, E.N.; Sadek, H.A. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **2011**, *331*, 1078–1080. [[CrossRef](#)]
15. Bergmann, O.; Bhardwaj, R.D.; Bernard, S.; Zdunek, S.; Barnabe-Heider, F.; Walsh, S.; Zupicich, J.; Alkass, K.;

- Buchholz, B.A.; Druid, H.; et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **2009**, *324*, 98–102. [[CrossRef](#)]
16. Eschenhagen, T.; Bolli, R.; Braun, T.; Field, L.J.; Fleischmann, B.K.; Frisen, J.; Giacca, M.; Hare, J.M.; Houser, S.; Lee, R.T.; et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation* **2017**, *136*, 680–686. [[CrossRef](#)]
 17. Vagnozzi, R.J.; Molkentin, J.D.; Houser, S.R. New Myocyte Formation in the Adult Heart: Endogenous Sources and Therapeutic Implications. *Circ. Res.* **2018**, *123*, 159–176. [[CrossRef](#)]
 18. Boubred, F.; Daniel, L.; Buffat, C.; Feuerstein, J.M.; Tsimaratos, M.; Oliver, C.; Dignat-George, F.; Lelievre-Pegorier, M.; Simeoni, U. Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2009**, *297*, F943–F951. [[CrossRef](#)]
 19. Yim, H.E.; Ha, K.S.; Bae, I.S.; Yoo, K.H.; Hong, Y.S.; Lee, J.W. Overweight, hypertension and renal dysfunction in adulthood of neonatally overfed rats. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1324–1333. [[CrossRef](#)]
 20. Granado, M.; Fernandez, N.; Monge, L.; Carreno-Tarragona, G.; Figueras, J.C.; Amor, S.; Garcia-Villalon, A.L. Long-term effects of early overnutrition in the heart of male adult rats: Role of the renin-angiotensin system. *PLoS ONE* **2014**, *8*, e65172. [[CrossRef](#)]
 21. Gonzalez-Hedstrom, D.; Guerra-Menendez, L.; Tejera-Munoz, A.; Amor, S.; de la Fuente-Fernandez, M.; Martin-Carro, B.; Arriazu, R.; Garcia-Villalon, A.L.L.; Granado, M. Overfeeding During Lactation in Rats is Associated with Cardiovascular Insulin Resistance in the Short-Term. *Nutrients* **2020**, *12*, 549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 22. Pereira, R.O.; Moreira, A.S.; de Carvalho, L.; Moura, A.S. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. *Regul. Pept.* **2006**, *136*, 117–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 23. Moreira, A.S.; Teixeira, M.T.; da Silveira Osso, F.; Pereira, R.O.; de Oliveira Silva-Junior, G.; de Souza, E.G.; de Lacerda, C.M.; Moura, A.S. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **2009**, *19*, 805–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 24. Achard, V.; Sanchez, C.; Tassistro, V.; Verdier, M.; Alessi, M.C.; Grino, M. Immediate Postnatal Overfeeding in Rats Programs Aortic Wall Structure Alterations and Metalloproteinases Dysregulation in Adulthood. *Am. J. Hypertens* **2016**, *29*, 719–726. [[CrossRef](#)]
 25. De Moura Freitas, C.; Nascimento, L.; Braz, G.R.F.; Andrade-Silva, S.C.; Lima-Junior, N.C.; de Araujo Silva, T.; Fernandes, M.P.; Ferreira, D.J.S.; Lagranha, C.J. Mitochondrial impairment following neonatal overfeeding: A comparison between normal and ischemic-reperused hearts. *J. Cell. Biochem.* **2018**. [[CrossRef](#)]
 26. De Lade, C.G.; Andreazzi, A.E.; Bolotari, M.; Costa, V.M.G.; Peters, V.M.; Guerra, M.O. Effects of moderate intensity endurance training vs. high intensity interval training on weight gain, cardiorespiratory capacity, and metabolic profile in postnatal overfed rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* **2018**, *10*, 70. [[CrossRef](#)]
 27. Sanchez-Garcia, G.; Del Bosque-Plata, L.; Hong, E. Postnatal overnutrition affects metabolic and vascular function reflected by physiological and histological changes in the aorta of adult Wistar rats. *Clin. Exp. Hypertens* **2018**, *40*, 452–460. [[CrossRef](#)]
 28. Pedroza, A.; Ferreira, D.S.; Santana, D.F.; da Silva, P.T.; de Aguiar Junior, F.C.A.; Sellitti, D.F.; Lagranha, C.J. A maternal low-protein diet and neonatal overnutrition result in similar changes to glomerular morphology and renal cortical oxidative stress measures in male Wistar rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2019**, *44*, 164–171. [[CrossRef](#)]
 29. Junior, M.D.F.; Cavalcante, K.V.N.; Ferreira, L.A.; Lopes, P.R.; Pontes, C.N.R.; Bessa, A.S.M.; Neves, A.R.; Francisco, F.A.; Pedrino, G.R.; Xavier, C.H.; et al. Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats. *Life Sci.* **2019**, *226*, 173–184. [[CrossRef](#)]
 30. Chavaglia Cavalet, L.; Dos Santos Ribeiro, L.C.; Rosa, G.B.; Sousa, K.K.; de Melo, A.B.S.; Campos, D.B.T.; Ferreira, L.A.; Amaral, N.O.; Calisto, Y.T.V.; de Castro, A.G.; et al. Long-term effects of early overfeeding and food restriction during puberty on cardiac remodeling in adult rats. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2020**, *11*, 492–498. [[CrossRef](#)]
 31. De Araujo, G.A.; Farias, R.D.S.; Pedro, S.S.; Rocha, N.N.; Brito, F.C.F.; Scaramello, C.B.V. Overweight during lactation and its implications for biometric, nutritional and cardiovascular parameters of young and adult male and female rats. *J. Nutr. Sci.* **2020**, *9*, e27. [[CrossRef](#)]
 32. Habbout, A.; Guenancia, C.; Lorin, J.; Rigal, E.; Fassot, C.; Rochette, L.; Vergely, C. Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 33. Siddeek, B.; Li, N.; Mauduit, C.; Chehade, H.; Rigal, E.; Tolsa, J.F.; Armengaud, J.B.; Zydorczyk, C.; Benahmed, M.; Vergely, C.; et al. Transient postnatal over nutrition induces long-term alterations in cardiac NLRP3-inflammasome pathway. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2018**, *28*, 944–951. [[CrossRef](#)]

34. Rigal, E.; Greco, C.; Porcherot, I.; Meloux, A.; Rochette, L.; Vergely, C. Long-term impact of postnatal nutritional programming on cardiac sensitivity to ischemia-reperfusion injury in vivo and on cardio-protective pathways in mice. *Eur. Heart J.* **2019**, *40*, 2824. [[CrossRef](#)]
35. Juvet, C.; Siddeek, B.; Zydorczyk, C.; Vergely, C.; Nardou, K.; Armengaud, J.B.; Benahmed, M.; Simeoni, U.; Cachat, F.; Chehade, H. Renal Programming by Transient Postnatal Overfeeding: The Role of Senescence Pathways. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Martins, M.R.; Vieira, A.K.; de Souza, E.P.; Moura, A.S. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *J. Endocrinol.* **2008**, *198*, 591–598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. 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.; et al. Overnourishment during lactation induces metabolic and haemodynamic heart impairment during adulthood. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **2015**, *25*, 1062–1069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bernardo, A.F.; Cortez, E.; Neves, F.A.; Vieira, A.K.; Soares, V.D.; Rodrigues-Cunha, A.C.; Andrade, D.C.; Thole, A.A.; Gabriel-Costa, D.; Brum, P.C.; et al. 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.* **2016**, *29*, 124–132. [[CrossRef](#)]
39. Plagemann, A.; Harder, T.; Rake, A.; Voits, M.; Fink, H.; Rohde, W.; Dorner, G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.* **1999**, *836*, 146–155. [[CrossRef](#)]
40. Heidel, E.; Plagemann, A.; Davidowa, H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. *Neuroreport* **1999**, *10*, 1827–1831. [[CrossRef](#)]
41. Harder, T.; Rake, A.; Rohde, W.; Doerner, G.; Plagemann, A. Overweight and increased diabetes susceptibility in neonatally insulin-treated adult rats. *Endocr. Regul.* **1999**, *33*, 25–31. [[PubMed](#)]
42. Plagemann, A.; Harder, T.; Rake, A.; Melchior, K.; Rohde, W.; Dorner, G. Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Brain Res.* **1999**, *818*, 160–163. [[CrossRef](#)]
43. Balonan, L.C.; Sheng, H.P. Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats. *Pediatr. Res.* **2000**, *48*, 668–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rodrigues, A.L.; de Moura, E.G.; Passos, M.C.; Trevenzoli, I.H.; da Conceicao, E.P.; Bonono, I.T.; Neto, J.F.; Lisboa, P.C. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 109–117. [[CrossRef](#)]
45. Conceicao, E.P.; Franco, J.G.; Oliveira, E.; Resende, A.C.; Amaral, T.A.; Peixoto-Silva, N.; Passos, M.C.; Moura, E.G.; Lisboa, P.C. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition—role of insulin resistance. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 81–87. [[CrossRef](#)]
46. Boullu-Ciocca, S.; Dutour, A.; Guillaume, V.; Achard, V.; Oliver, C.; Grino, M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: Its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes* **2005**, *54*, 197–203. [[CrossRef](#)]
47. Boullu-Ciocca, S.; Achard, V.; Tassistro, V.; Dutour, A.; Grino, M. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. *Diabetes* **2008**, *57*, 669–677. [[CrossRef](#)]
48. Kayser, B.D.; Goran, M.I.; Bouret, S.G. Perinatal overnutrition exacerbates adipose tissue inflammation caused by high-fat feeding in C57BL/6J mice. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121954. [[CrossRef](#)]
49. Bei, F.; Jia, J.; Jia, Y.Q.; Sun, J.H.; Liang, F.; Yu, Z.Y.; Cai, W. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis.* **2015**, *14*, 96. [[CrossRef](#)]
50. Boullu-Ciocca, S.; Tassistro, V.; Dutour, A.; Grino, M. Pioglitazone in adult rats reverses immediate postnatal overfeeding-induced metabolic, hormonal, and inflammatory alterations. *Endocrine* **2015**, *50*, 608–619. [[CrossRef](#)]
51. Morris, M.J.; Velkoska, E.; Cole, T.J. Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: Impact of early overnourishment. *Exp. Physiol.* **2005**, *90*, 697–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Dias, I.; Salviano, I.; Mencialha, A.; de Carvalho, S.N.; Thole, A.A.; Carvalho, L.; Cortez, E.; Stumbo, A.C. Neonatal overfeeding impairs differentiation potential of mice subcutaneous adipose mesenchymal stem cells. *Stem. Cell Rev. Rep.* **2018**, *14*, 535–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Plagemann, A.; Harder, T.; Brunn, M.; Harder, A.; Roepke, K.; Wittrock-Staar, M.; Ziska, T.; Schellong, K.; Rodekamp, E.; Melchior, K.; et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 4963–4976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, N.; Ma, H.; Li, J.; Meng, C.; Zou, J.; Wang, H.; Liu, K.; Liu, M.; Xiao, X.; Zhang, H.; et al. HSF1 functions as a key defender against palmitic acid-induced ferroptosis in cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2020**, *150*, 65–76. [[CrossRef](#)]
55. Van Eickels, M.; Grohe, C.; Cleutjens, J.P.; Janssen, B.J.; Wellens, H.J.; Doevendans, P.A. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* **2001**, *104*, 1419–1423. [[CrossRef](#)]
56. Velkoska, E.; Cole, T.J.; Morris, M.J. Early dietary intervention: Long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2005**, *288*, E1236–E1243. [[CrossRef](#)]
57. Smith, C.C.; Yellon, D.M. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol. Ther.* **2011**, *129*, 206–219. [[CrossRef](#)]
58. Su, X.; Peng, D. Emerging functions of adipokines in linking the development of obesity and cardiovascular diseases. *Mol. Biol. Rep.* **2020**, *47*, 7991–8006. [[CrossRef](#)]
59. Yim, H.E.; Ha, K.S.; Bae, I.S.; Yoo, K.H.; Hong, Y.S.; Lee, J.W. Postnatal early overnutrition dysregulates the intrarenal renin-angiotensin system and extracellular matrix-linked molecules in juvenile male rats. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 937–945. [[CrossRef](#)]
60. Rochette, L.; Lorin, J.; Zeller, M.; Guillard, J.C.; Lorgis, L.; Cottin, Y.; Vergely, C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacol. Ther.* **2013**, *140*, 239–257. [[CrossRef](#)]
61. Manrique, C.; Lastra, G.; Sowers, J.R. New insights into insulin action and resistance in the vasculature. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2014**, *1311*, 138–150. [[CrossRef](#)]
62. Boden, G.; Song, W.; Pashko, L.; Kresge, K. In vivo effects of insulin and free fatty acids on matrix metalloproteinases in rat aorta. *Diabetes* **2008**, *57*, 476–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Alcazar, M.A.; Boehler, E.; Rother, E.; Amann, K.; Vohlen, C.; von Horsten, S.; Plank, C.; Dotsch, J. Early postnatal hyperalimentation impairs renal function via SOCS-3 mediated renal postreceptor leptin resistance. *Endocrinology* **2012**, *153*, 1397–1410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Yim, H.E.; Yoo, K.H. Early life obesity and chronic kidney disease in later life. *Pediatr. Nephrol.* **2015**, *30*, 1255–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Granado, M.; Amor, S.; Fernandez, N.; Carreno-Tarragona, G.; Iglesias-Cruz, M.C.; Martin-Carro, B.; Monge, L.; Garcia-Villalon, A.L. Effects of early overnutrition on the renal response to Ang II and expression of RAAS components in rat renal tissue. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **2017**, *27*, 930–937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sominsky, L.; Ong, L.K.; Ziko, I.; Dickson, P.W.; Spencer, S.J. Neonatal overfeeding increases capacity for catecholamine biosynthesis from the adrenal gland acutely and long-term in the male rat. *Mol. Cell Endocrinol.* **2018**, *470*, 295–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Piquereau, J.; Ventura-Clapier, R. Maturation of Cardiac Energy Metabolism During Perinatal Development. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Bon-Mathier, A.C.; Rignault-Clerc, S.; Biemann, C.; Rosenblatt-Velin, N. Oxygen as a key regulator of cardiomyocyte proliferation: New results about cell culture conditions! *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2020**, *1867*, 118460. [[CrossRef](#)]
69. Hortells, L.; Johansen, A.K.Z.; Yutzey, K.E. Cardiac Fibroblasts and the Extracellular Matrix in Regenerative and Nonregenerative Hearts. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **2019**, *6*, 29. [[CrossRef](#)]
70. Williams, C.; Quinn, K.P.; Georgakoudi, I.; Black, L.D., 3rd. Young developmental age cardiac extracellular matrix promotes the expansion of neonatal cardiomyocytes in vitro. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 194–204. [[CrossRef](#)]
71. Vargas, R.; Vasquez, I.C. Effects of overfeeding and high-fat diet on cardiosomatic parameters and cardiac structures in young and adult zebrafish. *Fish. Physiol. Biochem.* **2017**, *43*, 1761–1773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Fan, X.; Turdi, S.; Ford, S.P.; Hua, Y.; Nijland, M.J.; Zhu, M.; Nathanielsz, P.W.; Ren, J. Influence of gestational overfeeding on cardiac morphometry and hypertrophic protein markers in fetal sheep. *J. Nutr. Biochem.* **2011**, *22*, 30–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Honkoop, H.; de Bakker, D.E.; Aharonov, A.; Kruse, F.; Shakked, A.; Nguyen, P.D.; de Heus, C.; Garric, L.; Muraro, M.J.; Shoffner, A.; et al. Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by ErbB2 signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart. *eLife* **2019**, *8*, e50163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Mills, R.J.; Titmarsh, D.M.; Koenig, X.; Parker, B.L.; Ryall, J.G.; Quaipe-Ryan, G.A.; Voges, H.K.; Hodson, M.P.; Ferguson, C.; Drowley, L.; et al. Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E8372–E8381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Cardoso, A.C.; Lam, N.T.; Savla, J.J.; Nakada, Y.; Pereira, A.H.M.; Elnwasany, A.; Menendez-Montes, I.; Ensley, E.L.; Petric, U.B.; Sharma, G.; et al. Mitochondrial Substrate Utilization Regulates Cardiomyocyte Cell Cycle Progression. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 167–178. [[CrossRef](#)]
76. Lim, G.B. Inhibiting fatty acid oxidation promotes cardiomyocyte proliferation. *Nat. Rev. Cardiol.* **2020**, *17*, 266–267. [[CrossRef](#)]
77. Li, S.; Li, H.; Yang, D.; Yu, X.; Irwin, D.M.; Niu, G.; Tan, H. Excessive Autophagy Activation and Increased Apoptosis Are Associated with Palmitic Acid-Induced Cardiomyocyte Insulin Resistance. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 2376893. [[CrossRef](#)]
78. Kim, J.A.; Montagnani, M.; Chandrasekran, S.; Quon, M.J. Role of lipotoxicity in endothelial dysfunction. *Heart Fail. Clin.* **2012**, *8*, 589–607. [[CrossRef](#)]
79. Velkoska, E.; Cole, T.J.; Dean, R.G.; Burrell, L.M.; Morris, M.J. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1622–1627. [[CrossRef](#)]
80. Ahmed, A.; Delgado-Olguin, P. Embryonic programming of heart disease in response to obesity during pregnancy. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2020**, *1866*, 165402. [[CrossRef](#)]
81. Marousez, L.; Lesage, J.; Eberle, D. Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming? *Nutrients* **2019**, *11*, 2966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Pauwels, S.; Symons, L.; Vanautgaerden, E.L.; Ghosh, M.; Duca, R.C.; Bekaert, B.; Freson, K.; Huybrechts, I.; Langie, S.A.S.; Koppen, G.; et al. The Influence of the Duration of Breastfeeding on the Infant’s Metabolic Epigenome. *Nutrients* **2019**, *11*, 1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Liu, H.W.; Mahmood, S.; Srinivasan, M.; Smiraglia, D.J.; Patel, M.S. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1859–1869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Ramon-Krauel, M.; Pentinat, T.; Bloks, V.W.; Cebria, J.; Ribo, S.; Perez-Wienese, R.; Vila, M.; Palacios-Marin, I.; Fernandez-Perez, A.; Vallejo, M.; et al. Epigenetic programming at the Mogat1 locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance. *FASEB J.* **2018**, fj201700717RR. [[CrossRef](#)]
85. Li, G.; Petkova, T.D.; Laritsky, E.; Kessler, N.; Baker, M.S.; Zhu, S.; Waterland, R.A. Early postnatal overnutrition accelerates aging-associated epigenetic drift in pancreatic islets. *Environ. Epigenet.* **2019**, *5*, dvz015. [[CrossRef](#)]
86. Blin, G.; Liand, M.; Mauduit, C.; Chehade, H.; Benahmed, M.; Simeoni, U.; Siddeek, B. Maternal Exposure to High-Fat Diet Induces Long-Term Derepressive Chromatin Marks in the Heart. *Nutrients* **2020**, *12*, 181. [[CrossRef](#)]
87. Siddeek, B.; Mauduit, C.; Chehade, H.; Blin, G.; Liand, M.; Chindamo, M.; Benahmed, M.; Simeoni, U. Long-term impact of maternal high-fat diet on offspring cardiac health: Role of micro-RNA biogenesis. *Cell Death Discov.* **2019**, *5*, 71. [[CrossRef](#)]
88. Vergely, C.; Maupoil, V.; Clermont, G.; Bril, A.; Rochette, L. Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *420*, 209–216. [[CrossRef](#)]
89. Higuchi, Y.; Otsu, K.; Nishida, K.; Hirotani, S.; Nakayama, H.; Yamaguchi, O.; Matsumura, Y.; Ueno, H.; Tada, M.; Hori, M. Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2002**, *34*, 233–240. [[CrossRef](#)]
90. Rodriguez-Iturbe, B.; Pons, H.; Johnson, R.J. Role of the Immune System in Hypertension. *Physiol. Rev.* **2017**, *97*, 1127–1164. [[CrossRef](#)]
91. Wolf, D.; Ley, K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2019**, *124*, 315–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Epelman, S.; Liu, P.P.; Mann, D.L. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 117–129. [[CrossRef](#)]
93. Meng, X.; Yang, J.; Dong, M.; Zhang, K.; Tu, E.; Gao, Q.; Chen, W.; Zhang, C.; Zhang, Y. Regulatory T cells in cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Cardiol.* **2016**, *13*, 167–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Ilatovskaya, D.V.; Halade, G.V.; DeLeon-Pennell, K.Y. Adaptive immunity-driven inflammation and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2019**, *317*, H1254–H1257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. Turdi, S.; Ge, W.; Hu, N.; Bradley, K.M.; Wang, X.; Ren, J. 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.* **2013**, *55*, 117–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rochette, L.; Guenancia, C.; Gudjoncik, A.; Hachet, O.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Anthracyclines/ trastuzumab: New aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 326–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Richard, C.; Ghibu, S.; Delemas-Chalumeau, S.; Guillard, J.C.; Des Rosiers, C.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Rochette, L.; Vergely, C. Oxidative stress and myocardial gene alterations associated with Doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats persist for 2 months after treatment cessation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *339*, 807–814. [[CrossRef](#)]
98. Mitra, M.S.; Donthamsetty, S.; White, B.; Mehendale, H.M. High fat diet-fed obese rats are highly sensitive to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *231*, 413–422. [[CrossRef](#)]
99. Guenancia, C.; Lefebvre, A.; Cardinale, D.; Yu, A.F.; Ladoire, S.; Ghiringhelli, F.; Zeller, M.; Rochette, L.; Cottin, Y.; Vergely, C. Obesity As a Risk Factor for Anthracyclines and Trastuzumab Cardiotoxicity in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3157–3165. [[CrossRef](#)]
100. Guenancia, C.; Hachet, O.; Aboutabl, M.; Li, N.; Rigal, E.; Cottin, Y.; Rochette, L.; Vergely, C. Overweight in mice, induced by perinatal programming, exacerbates doxorubicin and trastuzumab cardiotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77*, 777–785. [[CrossRef](#)]
101. Ferguson, D.P.; Monroe, T.O.; Heredia, C.P.; Fleischmann, R.; Rodney, G.G.; Taffet, G.E.; Fiorotto, M.L. Postnatal undernutrition alters adult female mouse cardiac structure and function leading to limited exercise capacity. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 1855–1872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Visker, J.R.; Ferguson, D.P. Postnatal undernutrition in mice causes cardiac arrhythmogenesis which is exacerbated when pharmacologically stressed. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2018**, *9*, 417–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Pendergrast, L.A.; Leszczynski, E.C.; Visker, J.R.; Triplett, A.N.; Ferguson, D.P. Early life undernutrition reduces maximum treadmill running capacity in adulthood in mice. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2020**, *45*, 240–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Zydorczyk, C.; Li, N.; Chehade, H.; Mosig, D.; Bidho, M.; Keshavjee, B.; Armengaud, J.B.; Nardou, K.; Siddeek, B.; Benahmed, M.; et al. Transient postnatal overfeeding causes liver stress-induced premature senescence in adult mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12911. [[CrossRef](#)]
105. Zydorczyk, C.; Li, N.; Rigal, E.; Chehade, H.; Mosig, D.; Armengaud, J.B.; Rolle, T.; Krishnasamy, A.; Orozco, E.; Siddeek, B.; et al. Calorie Restriction in Adulthood Reduces Hepatic Disorders Induced by Transient Postnatal Overfeeding in Mice. *Nutrients* **2019**, *11*, 2796. [[CrossRef](#)]
106. Previante, C.; Malta, A.; Miranda, R.A.; Martins, I.P.; Pavanello, A.; de Oliveira, J.C.; Prates, K.V.; Alves, V.S.; Francisco, F.A.; Moreira, V.M.; et al. Early metformin treatment improves pancreatic function and prevents metabolic dysfunction in early overfeeding male rats at adulthood. *Exp. Physiol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
107. Gerdts, E.; Regitz-Zagrosek, V. Sex differences in cardiometabolic disorders. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 1657–1666. [[CrossRef](#)]
108. Parra-Vargas, M.; Ramon-Krauel, M.; Lerin, C.; Jimenez-Chillaron, J.C. Size Does Matter: Litter Size Strongly Determines Adult Metabolism in Rodents. *Cell Metab.* **2020**, *32*, 334–340. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

III. Développement cardiaque

A. Développement cardiaque fœtal

Le cœur est le premier organe fonctionnel formé lors du développement embryonnaire, sa formation débutant de façon très précoce à partir des cellules issues du mésoderme [137, 138]. A travers des cascades complexes de signalisation spatialement et temporellement coordonnées, ces cellules migrent et viennent former les cellules progénitrices cardiaques. Ces dernières se spécialisent ensuite en différents types cellulaires, cardiomyocytes, fibroblastes, cellules conductrices, musculaires lisses ou encore endothéliales, pour venir former les 4 cavités myocardiques et aboutir *in fine* à la formation d'un organe contractile optimal [139].

La morphogénèse cardiaque s'accompagne d'une intense activité cellulaire mitotique. Les progéniteurs cardiaques puis les cardiomyocytes différenciés possèdent une importante capacité proliférative permettant la croissance du cœur à mesure que se forment les oreillettes et les ventricules. Chez la souris, le pic de prolifération des cardiomyocytes a lieu entre 10 et 12 jours de gestation (E10-E12) puis diminue progressivement jusqu'à la naissance [140, 141].

B. Développement cardiaque postnatal

1. Prolifération des cardiomyocytes

Chez les mammifères, le cœur a longtemps été considéré comme un organe post-mitotique possédant un nombre de cardiomyocytes défini à la naissance et n'ayant pas la capacité de proliférer ni de se régénérer. Cette observation a néanmoins été remise en question lorsque des études ont montré, chez l'Homme et l'animal, qu'une faible régénération des cardiomyocytes était possible. En effet, chez l'Homme adulte, la datation de carbone 14 dans l'ADN de cellules myocardiques a permis de mettre en évidence l'existence d'un renouvellement annuel des cardiomyocytes de 0,2 à 2%, démontrant ainsi une capacité proliférative de ces cellules cardiaques [142, 143]. Bien que ces pourcentages aient été par la suite remis en question, d'autres données ont corroboré l'idée que les certains cardiomyocytes conservent une capacité à proliférer [144]. Dans le cœur de souris adulte, l'existence d'un renouvellement des cardiomyocytes annuel de 1,3 à 4% par prolifération de cardiomyocytes résidents a également été observée [145]. Cependant, malgré cette capacité

encore présente, la prolifération des cardiomyocytes adultes reste très limitée et ne permet pas de régénérer complètement le myocarde à la suite d'un événement cardiaque.

Par ailleurs, chez la souris juvénile, il a été observé qu'une ablation de 15% de l'apex, 1 jour après la naissance, permettait d'initier une réponse régénérative par prolifération de cardiomyocytes préexistants et d'ainsi restaurer l'architecture et la fonction cardiaque [146]. Néanmoins, une ablation apicale identique réalisée chez des souris nouveau-nées de 7 jours n'a pas entraîné de régénération de l'apex mais plutôt la formation de fibrose, indiquant que cette capacité proliférative est perdue au bout d'une semaine de vie.

D'autres études ont par la suite montré, chez les mammifères, l'existence d'une courte période postnatale au cours de laquelle les cardiomyocytes ont la capacité de proliférer [147, 148]. Néanmoins, cette fenêtre proliférative disparaît au cours des 7 jours suivant la naissance, parallèlement à l'apparition d'un phénomène de binucléation des cardiomyocytes.

2. Binucléation et hypertrophie des cardiomyocytes

Le processus de binucléation correspond à la réplication de l'ADN en l'absence de cytodivision résultant en la présence de deux noyaux au sein d'une même cellule ainsi qu'en la sortie du cycle cellulaire, ce qui marque alors la perte de capacité des cardiomyocytes à proliférer. Cette binucléation est donc une étape importante pour les cellules cardiaques vers un état de différenciation terminale. Les pourcentages de binucléation sont variables entre les mammifères. Chez l'Homme, il varie de 25 à 60% contre 80 à 90% chez la souris [140, 141]. Tandis que la binucléation débute peu avant la naissance jusqu'à la période postnatale immédiate chez l'Homme ou la brebis [149], chez le rongeur, elle commence après la naissance et se termine dans les 2 semaines suivant la naissance [150].

Cette transition marque également le passage du cœur vers une croissance hypertrophique, c'est-à-dire par augmentation de la taille des cardiomyocytes plutôt que par leur nombre, et qui va permettre la maturation du myocarde. L'hypertrophie cardiaque peut apparaître tout au long de la vie d'un individu, pendant la croissance, la grossesse ou encore chez les athlètes, en réponse à des augmentations de contrainte et de charge de travail. Elle est alors considérée comme physiologique ou compensatrice. Elle peut néanmoins s'avérer pathologique en cas de stress cardiaque prolongé et excessif, et conduire au développement de pathologies telles que l'insuffisance cardiaque, la mort subite ou encore l'arythmie [151, 152].

C. Facteurs régulateurs de prolifération des cardiomyocytes

La prolifération cellulaire implique une grande diversité de facteurs qui interviennent tout au long de la formation et de la croissance myocardique. Ces dernières années, de nombreuses recherches ont été conduites pour comprendre les mécanismes de régulation de la régénération cellulaire cardiaque et tenter de la stimuler [141, 153] (Figure 3).

1. Régulateurs du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se divise en quatre phases, -G1 (GAP1, phase de croissance) -S (synthèse, phase de réplication de l'ADN) -G2 (GAP2, phase de croissance) -M (mitose, division nucléaire et cytoplasmique), au cours desquelles la cellule grossit, duplique son matériel génétique et se divise en deux cellules filles identiques. Ces étapes sont strictement régulées par des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (CDKs : cyclin-dependent kinases, une famille de sérine/thréonine kinases). La liaison des CDKs avec leurs partenaires cyclines permet l'activation de leur activité kinase et leur confère une spécificité de substrat permettant ainsi la progression de la cellule dans le cycle cellulaire et la transition entre les différentes phases. Chez les mammifères, une vingtaine de CDKs et quatre classes de cyclines majoritaires (D, E, A et B) ont été mises en évidence. Au cours du développement cardiaque embryonnaire les principaux complexes observés sont cycline D-CDK4/6 (G1 phase) et cycline E-CDK2 (phase G1/S), CDK1/2-cycline A (phase S/G2) et CDK1-cycline B (phase M). Leurs taux diminuent progressivement jusqu'à la naissance et restent ensuite très faibles tout au long de la vie [154]. L'activité des complexes cycline-CDK est finement régulée par les inhibiteurs de CDKs (CKIs : cyclin-dependent kinase inhibitors). Elles sont divisées en deux familles : les membres de la famille INK4 qui se lient à CDK4 et CDK6 et ceux de la famille CIP/KIP qui peuvent inhiber les complexes cycline-CDK. Après la naissance, parallèlement à la diminution d'expression des cyclines-CDKs, une augmentation de l'expression des CKIs p21^{cip1} et p27^{kip1} a été observée, participant fortement à la sortie des cardiomyocytes du cycle cellulaire [155].

L'activité des cyclines-CDKs et CKIs est étroitement liée à celle des facteurs de transcription. Les facteurs de transcription E2F sont une famille de protéines qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et la synthèse de l'ADN et sont régulés par la protéine rétinoblastome (Rb). D'autres facteurs de transcription sont également impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme les facteurs de transcription Foxo1,

Foxo3 et Meis1, régulateurs des CKIs p15, p16 et p21 ou encore Tbx20 qui favorisent la prolifération [153, 156].

2. Voies de signalisation Hippo

La voie Hippo joue un rôle essentiel dans le contrôle de la taille des organes et notamment de la croissance cardiaque [157]. Ses principaux effecteurs sont les coactivateurs transcriptionnels YAP (Yes-associated protein) et TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif). Sous leur forme active, YAP et TAZ se lient aux facteurs de transcription TEAD (transcriptional enhanced associate domain) 1-4 pour activer l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et stimuler la prolifération cellulaire [156, 158]. L'activation de la voie Hippo par une cascade de signalisation kinase mène à la phosphorylation et l'inactivation de YAP et TAZ. L'expression de YAP dans le cœur de souris est importante au cours du développement fœtal et postnatal puis diminue et disparaît complètement à 12 semaines d'âge [157].

3. Oxygène et métabolisme

Les substrats métaboliques utilisés par le cœur et la disponibilité en oxygène sont également des facteurs importants dans la régulation de la prolifération des cardiomyocytes. La naissance marque le passage du cœur d'un environnement fœtal relativement pauvre à un environnement riche en oxygène. Cette transition s'accompagne de profonds changements métaboliques, notamment une importante augmentation de la phosphorylation oxydative dépendante de l'oxygène dans la mitochondrie. Il a été montré que cette augmentation du métabolisme oxydatif mitochondrial induisait l'arrêt du cycle cellulaire à travers des lésions de l'ADN causées par la production de ROS [159]. L'étude de cardiomyocytes néonataux en culture *in vitro* a également mis en évidence une augmentation de leur prolifération en présence de faibles taux d'oxygène (3%) par rapport à des taux plus élevés (20%) [107]. Les effets de l'hypoxie sur la prolifération des cardiomyocytes seraient en partie médiés par HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α), un régulateur de transcription qui agit comme capteur d'oxygène. En condition hypoxique, HIF1 α est transloqué dans le noyau afin d'activer l'expression d'un certain nombre de gènes visant à s'adapter aux faibles taux d'oxygène. Il a été observé que HIF1 α est directement capable de réprimer les gènes codant pour les CKIs p21 et p27 et d'augmenter le transport du glucose et la glycolyse [160].

L'augmentation de la phosphorylation oxydative mitochondriale entraîne également des changements de substrats métaboliques du glucose vers les acides gras. Au cours du développement, il a été montré que le métabolisme glycolytique était associé à la prolifération des cardiomyocytes [161], le glucose étant inhibiteur de leur maturation [161, 162]. A l'inverse, après la naissance, l'augmentation d'utilisation des acides gras cardiaque entraîne la maturation cellulaire et marque la fin de la prolifération des cardiomyocytes [163]. Ainsi, l'inhibition du métabolisme des acides gras stimule la prolifération des cardiomyocytes de cœurs postnataux, ce qui mène à une extension de la fenêtre proliférative postnatale [164, 165]. Là encore, une importante production mitochondriale de ROS conduisant à une augmentation des lésions de l'ADN et entraînant une sortie du cycle cellulaire serait mise en cause [164], mais la répression des voies de signalisation β -caténine et YAP1 par les acides gras induisant la maturation des cardiomyocytes pourrait être également être impliquée [163].

4. Facteurs de croissance

La prolifération des cardiomyocytes fœtaux et postnataux est fortement influencée par la signalisation d'un grand nombre de facteurs de croissance. Plusieurs FGF (Fibroblast Growth Factors), IGF (Insulin Growth Factor) 1 et 2 et NRG1 (Neuregulin 1) ont ainsi été mis en évidence [156, 166]. Ces facteurs de croissance régulent les entrées et sorties du cycle cellulaire principalement à travers la voie de signalisation PI3K/Akt. Lorsqu'elle est activée, la voie PI3K/Akt vient activer l'expression de cyclines et CDK, inhiber celle de p27 ou encore inactiver la voie GSK-3 β afin de réguler positivement la prolifération des cardiomyocytes [153].

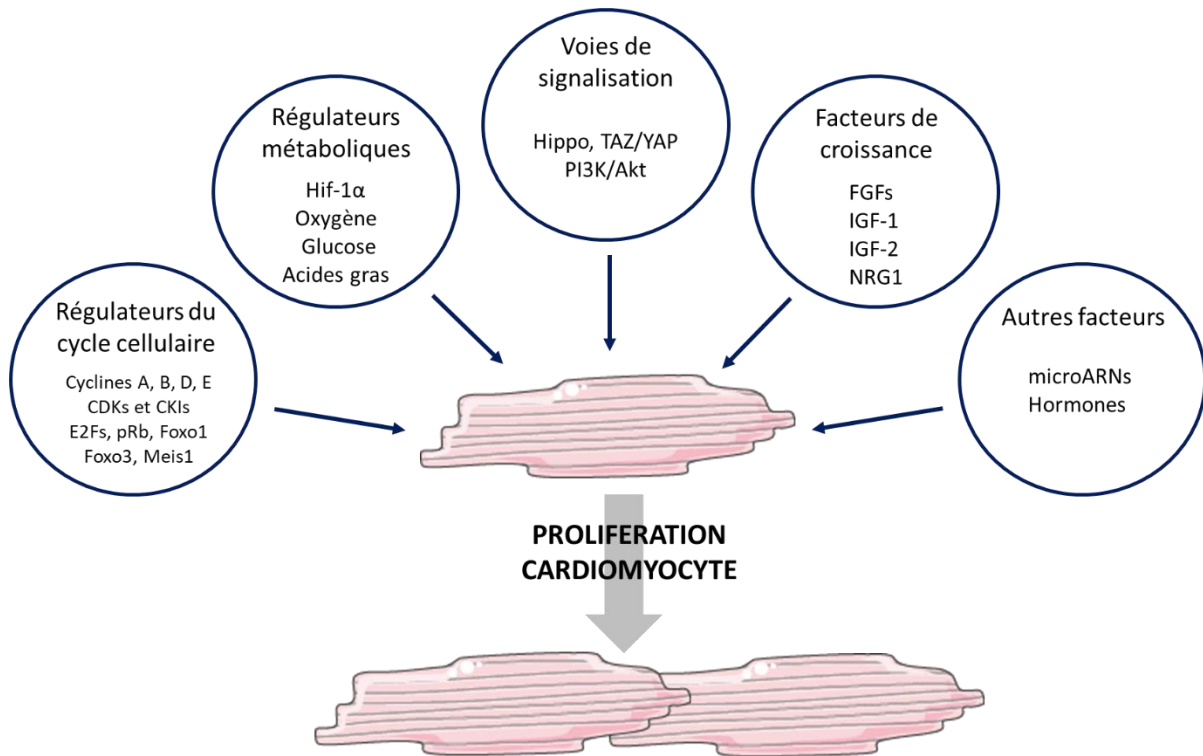


Figure 3 : Régulateurs intra et extracellulaires de la prolifération des cardiomyocytes.

Différentes catégories de molécules et voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération des cardiomyocytes. Schéma inspiré de Secco et Giacca, 2023 [153].

D. Métabolisme cardiaque

Pour assurer son travail de pompe et subvenir aux besoins de l'organisme, le cœur nécessite une quantité d'énergie importante et continue. Or, celui-ci possède très peu de réserves énergétiques, il doit donc en produire en permanence sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP) afin d'assurer sa fonction contractile [167, 168].

Afin de fournir cet ATP, le cœur est capable de cataboliser une grande diversité de substrats métaboliques : les acides gras, le glucose, le lactate, les corps cétoniques ou encore les acides aminés. Cette flexibilité d'utilisation lui permet de s'adapter selon la disponibilité des substrats et ses besoins métaboliques (Figure 4).

Malgré tout, dans un cœur sain adulte, plus de 90% de l'ATP est produite par la respiration mitochondriale à travers la phosphorylation oxydative. Un important réseau de mitochondries est donc nécessaire pour remplir cette tâche, c'est pourquoi, dans le myocarde, la masse mitochondriale représente un tiers du volume total des cardiomyocytes [169].

1. Métabolisme des acides gras

Afin d'alimenter la machinerie mitochondriale, les acides gras sont les substrats métaboliques préférentiels du myocarde et sont responsables de 50 à 70% de la production d'ATP dans le cœur (Figure 4) [170].

Les acides gras sont acheminés au cœur sous forme d'acides gras libres (AGL) ou d'acides gras libérés par les triglycérides contenus dans les chylomicrons ou les lipoprotéines à très basse densité (VLDL : very-low-density lipoproteins). Après leur entrée dans la cellule, par diffusion simple ou à travers des protéines transporteurs, ils sont convertis en acyl-coenzyme A (CoA) par l'enzyme acyl-CoA synthétase (FACS). L'acyl-CoA nouvellement formé est transporté à travers la membrane interne de la mitochondrie pour intégrer la voie de la β -oxydation. Cette dernière permet l'oxydation de l'acyl-CoA en acétyl-CoA afin d'intégrer le cycle de Krebs pour produire des équivalents réduits, la flavine adénine dinucléotide ($FADH_2$) et le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Ces cofacteurs réduits permettent ensuite, via la chaîne respiratoire de la membrane mitochondriale, de produire de l'ATP à partir d'ADP grâce à la phosphorylation oxydative.

2. Métabolisme du glucose

Le métabolisme du glucose permet également la production d'ATP dans les cellules cardiaques (Figure 4). Les cellules cardiaques peuvent utiliser le glucose exogène provenant de la circulation sanguine ou celui dérivé des stocks de glycogène intracellulaires. Le caractère hydrophile de la bicouche lipidique de la membrane plasmique la rend imperméable au passage du glucose dans la cellule, son entrée est donc médiée par des transporteurs spécifiques, les GLUT (Glucose Transporter). Dans le cœur, les deux isoformes qui existent sont les GLUT-1 et GLUT-4. Les GLUT-1 sont prédominants dans le cœur fœtal alors que dans le cœur sain adulte ce sont les GLUT-4 [171]. Une fois dans le cytosol, le glucose est converti en glucose-6-phosphate par l'enzyme hexokinase. Cette conversion du glucose lui permet d'être catabolisé par la voie de la glycolyse ou 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 puis en acétyl-CoA pour permettre son passage dans le cycle de Krebs et permettre la production de cofacteur réduit NADH et $FADH_2$.

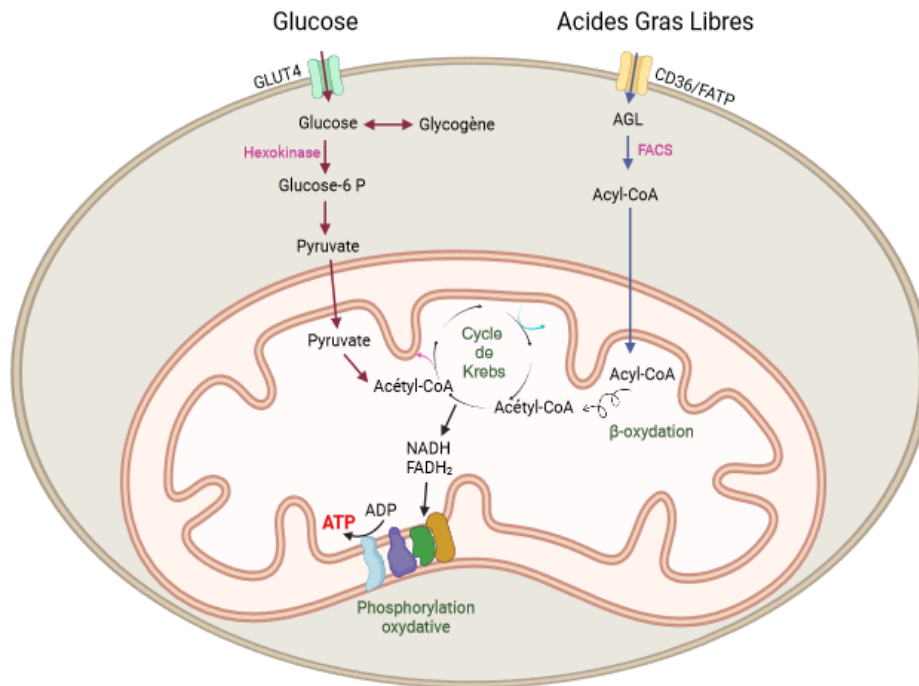


Figure 4 : Schématisation du métabolisme énergétique dans le myocarde

Dans le cœur sain, la production d'énergie sous forme d'ATP est assurée par l'oxydation des acides gras et du glucose. Les acides gras et le glucose entrent dans la cellule et sont transformés en acyl-CoA et en pyruvate respectivement. Une fois dans la mitochondrie, ces deux molécules permettent de former de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs pour produire de l'ATP grâce à la phosphorylation oxydative. AGL : Acides Gras Libres ; FACS : Fatty-Acyl-CoA Synthase ; GLUT4 : Glucose Transporter 4 ; FATP : Fatty Acid Transporter Protein. Schéma inspiré de Foretz et al. 2006 [172].

3. Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative ayant lieu dans la mitochondrie se déroule en trois étapes : la formation d'une réserve de cofacteur réduits NADH et FADH₂, le transfert des électrons dans la chaîne respiratoire et la phosphorylation de l'ADP pour la production d'ATP.

L'utilisation des acides gras et du glucose permet donc la production des cofacteurs NAD et FADH en NADH et FADH₂ afin qu'ils intègrent par la suite la chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne respiratoire située dans la membrane mitochondriale consiste en quatre complexes protéiques qui permettent le transport d'électrons jusqu'à l'oxygène, son accepteur final. Ces électrons sont cédés par les équivalents réduits NADH et FADH₂ tous deux oxydés au niveau des complexes I (NADH-coenzyme Q réductase) et II (succinate-coenzyme Q réductase) respectivement. Chacune de ces oxydations libère deux électrons transportés successivement

jusqu'au complexe III, au cytochrome c et au complexe IV par la coenzyme Q pour réagir finalement avec l'oxygène et produire des molécules d'eau. L'énergie générée par ce transport d'électrons permet le transfert de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV formant ainsi un gradient électrochimique de protons. Le retour des protons dans le sens de ce gradient électrochimique permet d'activer l'ATP synthase (complexes F₀F₁ ou complexe V), une enzyme membranaire qui catalyse la conversion d'ADP + Pi en ATP grâce à l'utilisation de la force protomotrice.

4. Transition métabolique postnatale

Comme évoqué précédemment, un changement de substrat métabolique préférentiel du cœur est observé après la naissance. En effet, au cours du développement cardiaque fœtal, le glucose est le substrat énergétique principalement utilisé pour intégrer la glycolyse anaérobie [168]. Cette glycolyse représente alors près de la moitié des apports énergétiques cardiaques tandis que l'oxydation des acides gras y contribue à moins de 15%. La voie catabolique glycolytique anaérobie est non seulement adaptée aux conditions pauvres en oxygène dans lesquelles se développe le fœtus (2% à 5% d'oxygène *in utero*), s'apparentant à un environnement hypoxique [107], mais également aux taux de glucose et de lactate circulants fœtaux plus importants que les taux d'acides gras. La naissance marque le passage de l'organisme dans un environnement riche en oxygène (20% d'oxygène atmosphérique) et à une alimentation riche en acides gras apportés par le lait maternel. La hausse de disponibilité d'oxygène et la capacité des acides gras à réprimer les voies d'utilisation des glucides provoque alors une transition vers une utilisation majoritaire des acides gras par phosphorylation oxydative dépendante de l'oxygène. Ce changement de substrat permet au cœur d'améliorer son efficacité métabolique (l'oxydation complète du glucose génère la production de 31 moles d'ATP / mole de glucose tandis que l'oxydation du palmitate génère 105 moles d'ATP / mole de palmitate) afin de répondre à l'importante demande énergétique nécessaire à la croissance et au maintien du débit cardiaque [173].

Une grande étude multi-omique réalisée chez la souris a mis en évidence les multiples changements génétiques, protéiques et métaboliques qui s'opèrent au cours de cette transition métabolique entre le premier jour postnatal et le sevrage faisant intervenir plus de 8 500 ARNm, 1 200 protéines et 150 métabolites [174].

IV. Insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde

A. L'infarctus du myocarde

A ce jour, les maladies cardiovasculaires restent l'une des causes principales de mortalité dans le monde. Parmi elles, les cardiopathies coronariennes, dont la principale représentation clinique est l'infarctus du myocarde (IDM), entraînent chaque année plus de 7 millions de décès [175].

L'IDM peut apparaître à la suite d'une ischémie cardiaque. Cette dernière se développe lors d'un déséquilibre entre la demande énergétique du cœur et son apport sanguin engendrant la mort des cellules cardiaques normalement perfusées. Le plus souvent, l'ischémie se manifeste lors d'une rupture de plaque coronarienne athérosclérotique, résultant en la formation d'un thrombus, puis en l'arrêt ou la diminution prolongée de l'afflux sanguin aux cellules cardiaques en aval [176-178]. Celles-ci vont alors mourir par apoptose et nécrose et engendrer une lésion tissulaire dont l'étendue dépend de la durée et de l'intensité de l'ischémie. En effet, pour une ischémie de courte durée suivie d'une reperfusion qui réenclenche rapidement l'activité métabolique des cardiomyocytes, les dommages cardiaques peuvent être réversibles ; en revanche, lorsque l'ischémie est prolongée, les dommages tissulaires deviennent irréversibles.

Les lésions engendrées par une ischémie cardiaque sont d'ordre hémodynamiques, métaboliques, électrophysiologiques et structuraux, conduisant à une altération de la contractilité myocardique et par conséquent une modification de l'hémodynamique physiologique.

La mort des cellules cardiaques va entraîner la libération de diverses protéines dans la circulation sanguine et le dosage de certaines d'entre elles permet de détecter la présence d'une souffrance myocardique. En clinique, le dosage de la troponine cardiaque T ou I hypersensible est l'un des éléments clés du diagnostic d'infarctus du myocarde [179]. En recherche pré-clinique, elle s'est également révélée être un marqueur prédictif de lésions myocardiques pertinentes puisque les taux de troponine I après l'induction d'un infarctus du myocarde chez la souris et le rat sont corrélés à la taille d'infarctus [180].

L'électrocardiogramme (ECG) est un outil essentiel de détection et de stratification de la gravité de l'IDM. L'identification d'anomalies caractéristiques comme l'élévation et le

décalage du segment ST ou des changements des ondes T ou Q, permettent d'en faire le diagnostic.

B. Cicatrisation et remodelage cardiaque post-infarctus

1. Inflammation

Un événement cardiaque ischémique est immédiatement suivi d'une réaction inflammatoire importante faisant intervenir des cytokines et cellules pro- et anti-inflammatoires [181, 182]. Une première phase d'inflammation précoce permet dans un premier temps de nettoyer et digérer les débris cellulaires et des éléments altérés de la matrice extracellulaire (MEC). Celle-ci se met en place très rapidement dès lors que les signaux de danger et de souffrance sont émis par les cellules nécrosées et que la MEC est endommagée. Ces signaux vont activer des cascades de médiateurs pro-inflammatoires, cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion cellulaire. Parmi ces cytokines on retrouve le TNF, l'IL-6, l'IL-1 β , IL-18, etc., dont la libération va ensuite permettre le recrutement des cellules immunitaires, monocytes et neutrophiles, afin de procéder au nettoyage de la zone ischémisée. Une seconde phase d'inflammation tardive intervient ensuite, dont l'objectif est la réparation et la prolifération tissulaire. Elle nécessite la présence de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF- β , nécessaires à la suppression de la phase inflammatoire aiguë et au recrutement des macrophages et des fibroblastes [183]. Ces derniers vont notamment produire les constituants de la MEC, en particulier du collagène, et permettre la formation de la cicatrice au niveau de la zone nécrosée.

2. Cicatrisation et fibrose cardiaque

La formation de la cicatrice fibreuse fait partie intégrante du processus de cicatrisation post-infarctus. Les fibroblastes recrutés au niveau de la zone infarctée prolifèrent et se différencient en myofibroblastes, des cellules intermédiaires entre les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Cette différenciation est activée par de nombreux stimuli tels que des facteurs de croissance (FGF, PDGF), des facteurs chimiotactiques (TGF- β ou IL-1), des voies neurohumorales comme par exemple le système rénine-angiotensine-aldostérone à travers le récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R) ou encore par étirement mécanique [184]. Une fois différenciés, les myofibroblastes ainsi que les fibroblastes produisent une large quantité de collagène, principalement de type 1 et 3, et des protéines de la MEC afin de former

la fibrose cicatricielle. Cette fibrose dite réparatrice ou de remplacement permet, comme son nom l'indique, de remplacer la perte de myocytes en cas de lésions cardiaques. Elle se distingue d'un second type de fibrose dite réactive, qui se développe dans les espaces périvasculaires et interstitiels. La présence ou non de fibrose cardiaque résulte de la balance entre la production et la dégradation du collagène et des composants de la MEC par les MMPs. Une régulation fine de cette balance est impérative pour le bon maintien de la structure et de la fonction cardiaque. Une accumulation excessive de fibrose dans les deux cas est associée au développement de dysfonctions systoliques et diastoliques, à la survenue d'arythmies ou encore participe au développement de l'insuffisance cardiaque [185]. Cependant, il est également important de souligner qu'une présence insuffisante de fibrose, après un infarctus du myocarde par exemple, peut entraîner la mort par rupture cardiaque [186, 187]

3. Dilatation et hypertrophie cardiaque

L'infarctus du myocarde et le remodelage cardiaque qui en découle entraînent avec le temps d'importants changements de la géométrie et de la fonction cardiaque. Dans un premier temps, la formation de la cicatrice fibreuse s'accompagne d'un amincissement de la paroi ventriculaire au niveau de la zone infarctée ainsi que d'une expansion de la zone nécrosée, causés par les contraintes accrues sur la paroi [171]. Cette expansion s'explique par le glissement des myofilaments nécrosés les uns sur les autres et le remaniement de la MEC. Elle a lieu dès les premières heures suivant l'apparition de l'IDM pendant le remodelage précoce et entraîne une dilatation rapide du ventricule [188]. Ce remodelage précoce et la surcharge en volume, selon le mécanisme de Frank-Starling, induisent un étirement des cardiomyocytes permettant une augmentation de la contractilité cardiaque et donc le maintien d'un débit cardiaque diminué mais suffisant malgré la perte de myocytes. En parallèle, l'élévation des contraintes pariétales mène à l'hypertrophie des cardiomyocytes non nécrosés selon la loi de Laplace. Cette hypertrophie compensatrice fait partie du remodelage ventriculaire tardif et permet également le maintien du volume d'éjection pendant un certain temps. De plus, l'activation du système nerveux sympathique permet au myocarde de s'adapter en augmentant sa fréquence et son inotrope cardiaque ainsi que le retour veineux. Mais cette activation sympathique prolongée entraîne à terme une désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques. La hausse des catécholamines dans le myocarde pourrait également initier la

réponse hypertrophique, de même que le système rénine-angiotensine-aldostérone et un grand nombre d'autres voies de signalisation (Figure 5) [189].

Malheureusement, bien que ce remodelage permette le maintien de la fonction systolique et diastolique pendant un certain temps, les effets délétères de ce processus apparaissent peu à peu, conduisant presque invariablement le cœur vers une insuffisance cardiaque.

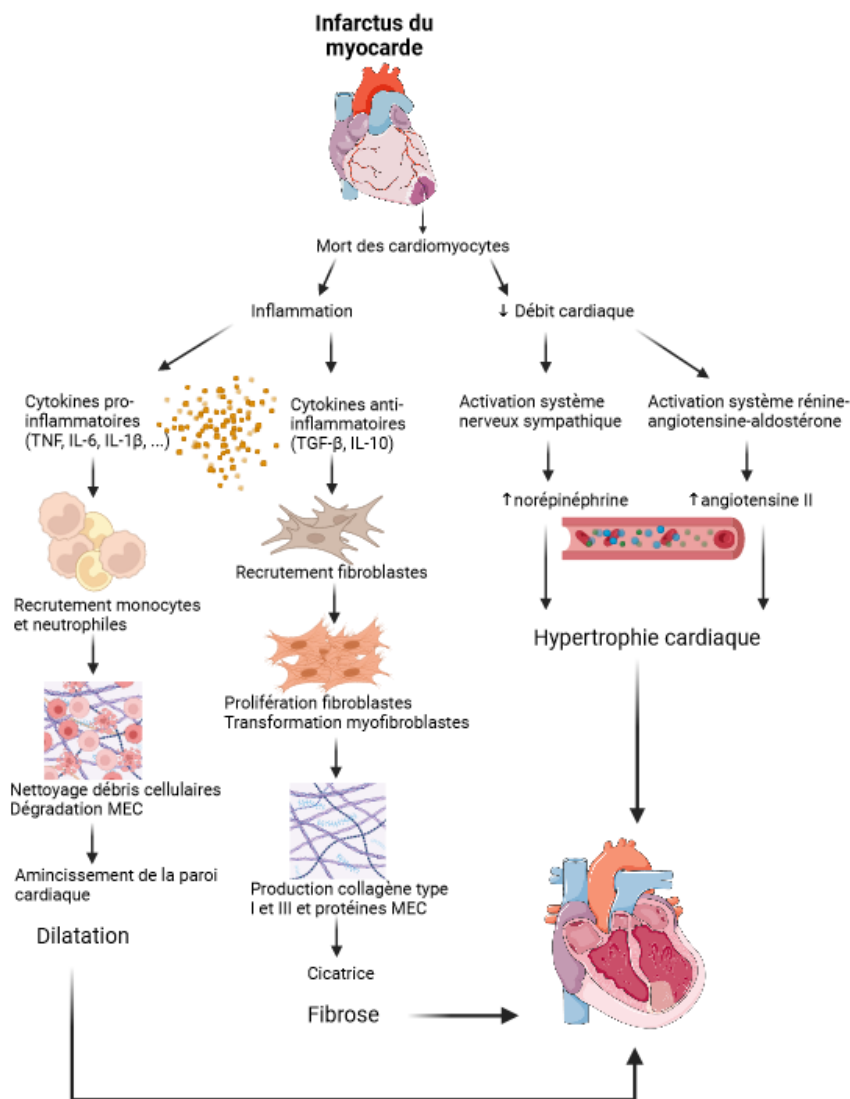


Figure 5 : Schématisation d'une partie des facteurs impliqués dans le remodelage cardiaque suivant un infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde entraîne la mort des cellules cardiaques et l'apparition d'une importante inflammation. Les monocytes et neutrophiles, recrutés par les cytokines pro-inflammatoires, permettent le nettoyage de la zone ischémiée et participent à l'apparition de la dilatation ventriculaire. Les fibroblastes, recrutés par les cytokines anti-inflammatoires, entraînent l'apparition de la fibrose cicatricielle. La diminution de débit cardiaque induite par la mort des cardiomyocytes entraîne

l'activation des systèmes nerveux sympathique et rénine-angiotensine-aldostérone. Ces deux systèmes participent au développement d'une hypertrophie cardiaque. Schéma inspiré de Sutton and Sharpe, 2000 [188].

C. L'insuffisance cardiaque

1. Prévalence et aspects cliniques

L'insuffisance cardiaque (IC) correspond à l'incapacité du myocarde à assurer un débit sanguin suffisant pour répondre aux demandes énergétiques du corps.

Dans les pays développés, elle touche 1 à 2% de la population. Sa prévalence varie fortement selon l'âge, aux Etats-Unis elle est inférieure à 1% chez les personnes de moins de 40 ans contre plus de 10% chez les personnes âgées de plus de 80 ans [190]. De plus, malgré d'importantes avancées thérapeutiques ces dernières années, l'espérance de vie dans les 5 ans après son diagnostic est seulement de 25 à 50%.

Le spectre des symptômes cliniques de l'IC est varié et dépend de la gravité de la maladie. Il comprend la dyspnée, la fatigue, la présence d'œdème, pulmonaire et/ou périphérique ou encore de la tachycardie [191]. Il existe plusieurs classifications regroupant ces différents symptômes, permettant de diagnostiquer la maladie et d'évaluer son avancement [192].

En se basant sur la mesure de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG), l'insuffisance cardiaque peut également être classée en deux catégories : l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (ICFER; FEVG < 40%) ou l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP; FEVG > 50%) [191]. Les patients ayant une ICFER présentent donc une altération du volume d'éjection systolique et du débit cardiaque tandis que les patients ayant une ICFEP présentent une contractilité relativement conservée mais une relaxation ventriculaire altérée. Enfin, les patients possédant une FEVG comprise entre 40% et 49% correspondent à une classification intermédiaire parfois étiquetée comme une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection moyenne (ICFEM) [191].

La cause principale d'insuffisance cardiaque est la pathologie cardiaque de type ischémique et plus particulièrement le remodelage cardiaque qui en découle [193]. L'autre étiologie principale d'insuffisance cardiaque, qui ne sera pas développée dans ce document, est l'HTA, mais des anomalies valvulaires (fuites ou sténoses), des cardiomyopathies congénitales, ou bien des rigidifications liées à l'âge ou à la surcharge en fer sont connues pour induire une insuffisance cardiaque. De nombreux facteurs de risque cardiovasculaire, qui peuvent

directement affecter la fonction cardiaque sont souvent combinés chez les patients insuffisants cardiaques comme l'hypertension artérielle, le diabète, l'âge ou encore l'obésité [192].

2. Paramètres de la fonction cardiaque

L'échocardiographie est un outil d'évaluation de la fonction systolique et diastolique. Son aspect non invasif, fiable et reproductible en fait une technique d'analyse de choix pour l'étude de la fonction cardiaque et le pronostic clinique de pathologies cardiovasculaires [194, 195]. En recherche expérimentale, les importants progrès technologiques ont rendu possible l'étude de la structure et fonction cardiaque chez le petit animal [196]. L'échocardiographie permet de mesurer un grand nombre de paramètres de la fonction contractile et de remplissage. Chez les patients à ICFer une altération des paramètres de la fonction systolique va plutôt être observée comme la fraction d'éjection systolique, la fraction de raccourcissement, le volume d'éjection télésystolique et télédiastolique tandis que chez les patients à ICFep ce sont plutôt les paramètres de la fonction diastolique qui sont atteints [191].

3. Mécanismes moléculaires

Aux premiers stades de l'insuffisance cardiaque, le système nerveux sympathique et le système rénine-angiotensine-aldostérone jouent un rôle compensatoire dans le but de maintenir le débit cardiaque et l'homéostasie circulatoire. Cependant, l'activation chronique de ces deux systèmes devient délétère et participe à l'aggravation de la pathologie, notamment par rétention d'eau et de sodium et vasoconstriction importante. La présence d'une surcharge de pression et de volume active de ce fait le système de libération des peptides natriurétiques [197]. Les peptides natriurétiques sont des neurohormones d'origine essentiellement cardiaque aux effets natriurétiques et vasodilatateurs. Les principaux sont l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide) et le BNP (Brain Natriuretic Peptide), produits par les oreillettes et les ventricules respectivement, alors que le CNP (C-type Natriuretic Peptide) est formé dans le cerveau et les cellules endothéliales. L'ANP et le BNP sont tous deux stockés dans des granules sécrétoires sous forme de pro-hormone, le proANP et le proBNP, qui sont clivés une fois sécrétés afin de libérer la forme biologiquement active de la protéine dans la circulation. Leur rôle principal est de réguler la volémie et la pression artérielle en favorisant l'excrétion rénale de sodium et d'eau et grâce à leur effet vasodilatateur direct et en inhibant

le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système nerveux sympathique. En situation d'insuffisance cardiaque, la libération de ces deux peptides est donc accrue pour tenter de contrecarrer la surstimulation des systèmes neuro-hormonaux vasoconstricteurs et ils représentent alors des biomarqueurs pertinents de diagnostic et de sévérité de l'IC, et plus particulièrement le BNP dont le niveau circulant est généralement très faible en l'absence de stress cardiaque [198].

Le développement du myocarde vers une insuffisance cardiaque est associé à des changements structurels et fonctionnels profonds. Parmi ces changements, s'opère au niveau moléculaire un phénomène de réactivation de l'expression des gènes fœtaux [199]. Ces gènes sont donc exprimés au cours du développement fœtal mais sont normalement réprimés chez l'adulte et sont impliqués dans le métabolisme, les mécanismes contractiles et électrophysiologiques ou encore l'expression neuro-hormonale cardiaque. Ainsi, une augmentation des gènes de la glycolyse est observée, traduisant le retour du glucose comme source d'énergie principale pour le muscle cardiaque aux dépens des acides gras [200]. Un changement d'expression des protéines sarcomériques responsables de la contraction des fibres musculaires cardiaques a également lieu. La myosine est une protéine sarcomérique au centre du mouvement de contraction musculaire. Elle est composée de deux chaînes lourdes (Myosin Heavy Chain : MHC) et deux chaînes légères (Myosin Light Chain : MLC). Il existe deux isoformes principaux de la chaîne lourde, l'une associée à une vitesse de contraction lente, la β -MHC, et une autre à contraction rapide, la α -MHC. De nombreuses études réalisées chez le rongeur ont mis en évidence que la β -MHC est l'isoforme principalement exprimée durant la période fœtale. Après la naissance, une inversion d'expression a lieu vers une prédominance de l'isoforme α -MHC. En situation de pathologie cardiaque, une réversion d'expression vers l'isoforme β -MHC est constatée chez la souris et le rat. Il est cependant important de noter que chez l'Homme, les deux isoformes β - et α -MHC sont exprimées au cours de la période fœtale, avec une prédominance d'expression de la β -MHC à l'âge adulte. Malgré tout, en réponse aux lésions cardiaques, un retour à l'isoforme fœtale est tout de même observé avec une baisse d'expression des 2 isoformes par rapport à un cœur sain [201].

La réexpression des peptides natriurétiques ANP et BNP fait également partie de la réexpression des gènes cardiaques fœtaux afin de permettre leur libération dans la circulation comme décrit précédemment.

Les raisons exactes sous-jacentes à cette reprogrammation cardiaque fœtale ne sont pas connues mais la présence d'une hypertrophie cardiaque pathologique serait mise en cause [202]. Comme pour le remodelage cardiaque, la réexpression de ces gènes cardiaque fœtaux apporte un bénéfice énergétique pour le cœur dans les premiers stades de l'insuffisance cardiaque, malheureusement leur expression aberrante résulte en des dysfonctions de la contractilité des cellules cardiaques, de l'homéostasie calcique, de la croissance cellulaire et à terme à une dysfonction cardiaque.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

De nombreuses études ont démontré l'importance de l'alimentation au cours de la période périnatale et notamment l'influence d'une suralimentation postnatale sur le risque métabolique et cardiovasculaire.

Chez la souris adulte, les conséquences de la SA au niveau du métabolisme et de la fonction cardiaque ont été décrites. Ainsi, en situation pathologique, les résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont montré une sensibilité accrue aux lésions d'ischémie-reperfusion des animaux SA. Cependant, il n'existe aucune donnée concernant l'impact de la SA sur le développement d'une insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde. Dans la continuité de ces observations, le premier objectif de cette Thèse a donc été d'étudier l'impact de la SA sur l'évolution de la fonction cardiaque plusieurs mois après un infarctus du myocarde induit expérimentalement. Dans ce contexte d'étude et aux vues des résultats précédents, nous nous attendons à observer le développement d'une insuffisance cardiaque plus précoce chez les souris SA que chez les souris contrôles.

Par ailleurs, sur le court terme, chez des rongeurs SA, des changements précoces de substrats métaboliques et d'autres facteurs circulants ont été observés dès 24 jours de vie. Ces modifications métaboliques s'accompagnent de changements structuraux cardiaques comprenant une hypertrophie des cardiomyocytes ou encore la présence de fibrose cardiaque plus importante. Néanmoins, à ce jour, aucune étude n'a étudié l'impact de la SA sur le devenir des cardiomyocytes après seulement quelques jours de vie. Le second objectif de ce travail de Thèse a donc été d'étudier les conséquences de la SA sur la prolifération et la maturation des cardiomyocytes, ainsi que les métabolites circulants dès 7 jours après la naissance. Au regard de l'arrêt rapide de prolifération des cardiomyocytes après la naissance et de la sensibilité de ces derniers aux différents substrats énergétiques disponibles, nous nous attendons à observer à ce qu'une SA induise des changements rapides des métabolites circulants, notamment des acides gras, qui pourraient jouer sur le taux de prolifération cardiomyocytaire postnatal chez les souris nouveau-nées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Modèle de suralimentation postnatale

Ce projet a été approuvé par le comité d'éthique local (Comité d'éthique de l'Expérimentation Animale, Université- Bourgogne-Franche-Comté, Dijon, France, protocole numéro 16589).

Des souris femelles et mâles C57BL6/J (Charles River, France) ont été mis en accouplement dans des cages individuelles contenant de l'eau et de la nourriture ad libitum pendant 5 jours. Les femelles ont été séparées et placées en cages individuelles pendant la durée de gestation et d'allaitement. Après la naissance, au deuxième jour de vie, les petits ont été rassemblés et les mâles distribués aléatoirement parmi les mères afin de former les deux groupes expérimentaux : le groupe de souris contrôles, normo-alimentées (NA), formé de 9 petits par portée et le groupe de souris soumises à une suralimentation postnatale (SA) formé de 3 petits par portée. 24 jours après la naissance, les souris ont été sevrées et pucées afin de permettre leur identification et de réaliser un suivi de poids corporel. Elles ont ensuite été rassemblées au nombre de 9 par cage selon leur groupe avec un accès ad libitum à l'eau et à une nourriture standard (A04, DAFE diets, Augy, France). 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.

II. Protocoles expérimentaux

A. Effet de la SA sur le développement de l'insuffisance cardiaque post-IDM

A l'âge de 4 mois, une échocardiographie a été réalisée chez les souris des 2 groupes NA et SA afin de mesurer les paramètres basaux de la fonction cardiaque. Elles ont ensuite été soumises à une chirurgie cardiaque *in vivo* afin d'induire un infarctus du myocarde ou une opération sham contrôle. Une fois la chirurgie cardiaque réalisée, un suivi échocardiographique a été effectué chaque mois pendant 6 mois post-IDM. 24 h après la chirurgie, un prélèvement sanguin mandibulaire a été réalisé afin de doser la quantité de troponine cardiaque plasmatique. A la fin de la dernière échocardiographie, le ventricule gauche et les poumons ont été prélevés afin d'être pesés. Le ventricule gauche a été coupé en deux zones distinctes, zone ischémiée (ZI) et zone éloignée de l'ischémie (ZE). Les morceaux de tissu ont été congelés

à -80°C pour ensuite étudier l'expression de gènes cibles par PCR ou conservés dans le PFA 4% pour réaliser des analyses histologiques (Figure 6).

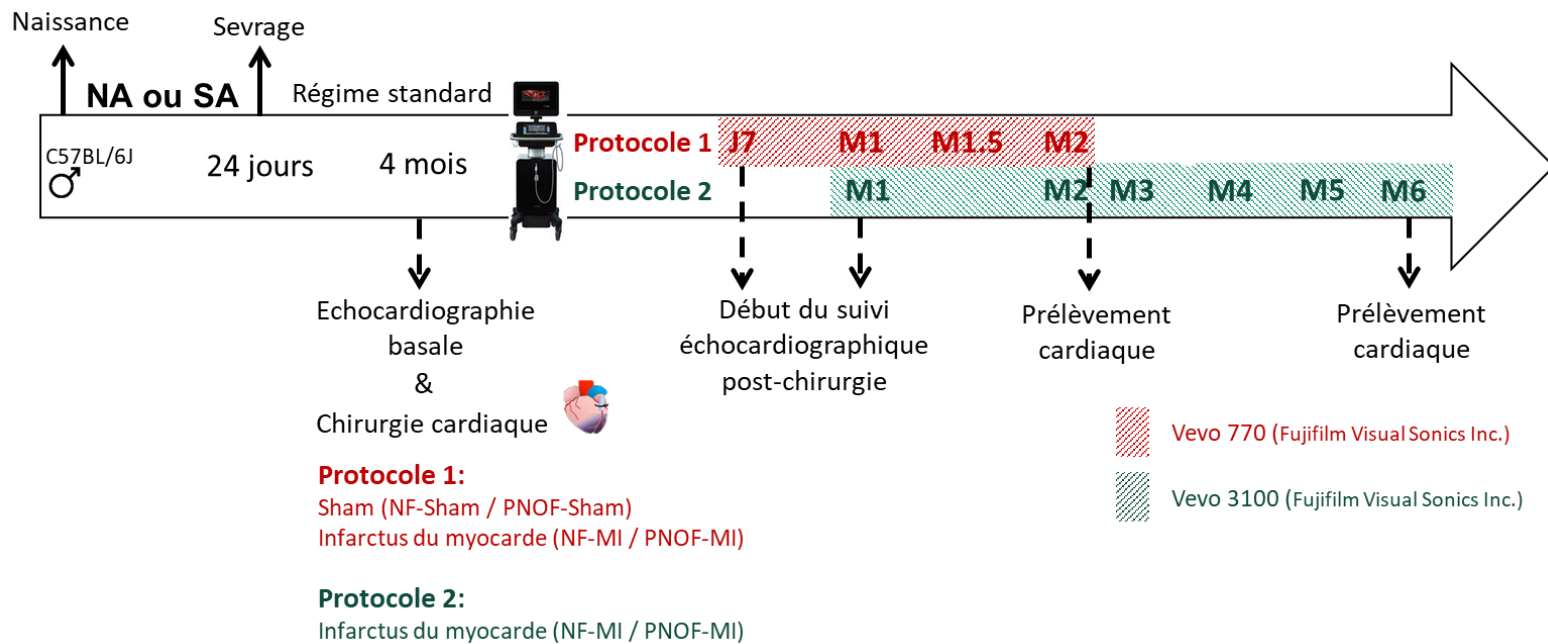


Figure 6 : Protocole expérimental des souris adultes NA et SA.

B. Effet de la SA sur la prolifération des cardiomyocytes

A l'âge de 7, 10 ou 24 jours, le plasma des nouveau-nés NA et SA anesthésiés a été prélevé par prélèvement intracardiaque avec une seringue héparinée puis congelé à -80°C pour réaliser les analyses biologiques (lipidomique et bilan lipidique). Le cœur a été rapidement prélevé, pesé puis conservé dans le paraformaldéhyde (PFA) 4% pour les analyses histologiques ou soumis à une digestion enzymatique pour isoler les cardiomyocytes (CMs). Après la digestion, les CMs ont été comptés (Figure 7).

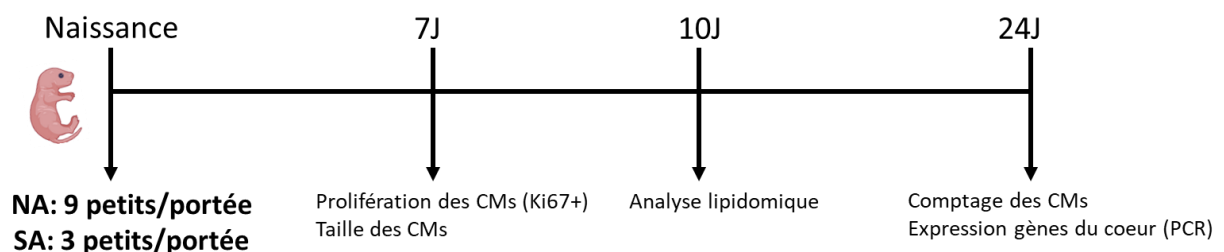


Figure 7: Protocole expérimental des nouveau-nés NA et SA.

CMs : cardiomyocytes

III. Procédures expérimentales

A. Ischémie cardiaque permanente *in vivo*

A l'âge de 4 mois, les souris adultes NA et SA ont été soumises à une chirurgie cardiaque *in vivo* afin d'induire un infarctus du myocarde expérimental par ligature permanente de l'artère interventriculaire antérieure (IVA). Les souris ont été placées sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane, 4% pendant 2 minutes pour l'induction de l'endormissement puis 2,5% pour toute la durée de la chirurgie. Après leur intubation, les souris ont reçu une injection d'analgésie générale (Buprecare, 0,075 mg/kg) et locale (Anesderm Gé). L'électrocardiogramme ainsi que la température ont été monitorés tout au long de la chirurgie au moyen du logiciel Lab chart (AD Instrument) et d'une sonde rectale, respectivement. Une fois les souris intubées et artificiellement ventilées (VentElite 55-7040, Harvard Apparatus), le thorax a été ouvert et les côtes écartées afin d'accéder au cœur. Un fil 8.0 a été placé autour de l'IVA et serré afin de bloquer toute circulation sanguine vers la zone qu'elle irrigue. Le décalage de la courbe SUS-ST sur l'ECG et le blanchiment du tissu de la zone de l'apex ont permis de visuellement confirmer la présence d'une ischémie cardiaque. La cage thoracique a ensuite été refermée au moyen de triples nœuds. Au réveil, les souris ont été placées dans une couveuse à 37°C (Cimuka PD30SH, Ducatillon) afin d'améliorer leur récupération post-opératoire. Une nouvelle injection de buprénorphine a été réalisée 2 h et 24 h après l'opération afin de maintenir une couverture analgésique.

B. Analyse échocardiographique

1. Examen échocardiographique

Les analyses de la fonction cardiaque ont été réalisées sur l'appareil d'échocardiographie Vevo 770 et Vevo 3100 (Fujifilm VISUAL SONICS), avec une sonde à haute fréquence de 30 MHz et 40 MHz, respectivement.

Les souris ont été placées sous anesthésie gazeuse, grâce à un mélange d'isoflurane (pourcentage variable) et d'oxygène (4,5 l/min). Une première phase d'endormissement a été réalisée pendant 2 minutes à 4% d'isoflurane dans une boîte à induction. Elles ont ensuite été placées en position supine sur une table chauffante, le museau placé dans un masque afin de poursuivre sous anesthésie légère à 2% d'isoflurane pour la suite de l'échographie. La

température a été monitorée tout au long de l'anesthésie avec une sonde rectale permettant de maintenir la température corporelle entre 36 et 37 degrés. Les pattes ont été placées sur des électrodes pour mesurer les paramètres physiologiques, la fréquence cardiaque et respiratoire et l'électrocardiogramme. Une crème dépilatoire a été appliquée sur le thorax suivi du gel d'échocardiographie.

Afin de mesurer la fonction systolique et diastolique, le cœur a été observé selon différentes coupes. La coupe parasternale grand axe (PSGA) obtenue en mode luminosité 2D (Brightness mode ou B-mode) a permis de visualiser le ventricule dans sa longueur, de la sortie d'aorte à l'apex (Figure 8). Cette vue a servi à l'acquisition des paramètres de la fonction contractile. Les enregistrements nécessaires à l'analyse de la fonction diastolique ont été obtenus en vue 4 cavités ; Cette coupe a permis de réaliser le Doppler pulsé et le Doppler tissulaire afin de mesurer la vitesse et la direction du flux sanguin et du tissu cardiaque respectivement (Figure 9A et 9B). Pour chacune des coupes observées, trois ciné-loop de plusieurs cycles cardiaques ont été enregistrés pour les analyses ultérieures.

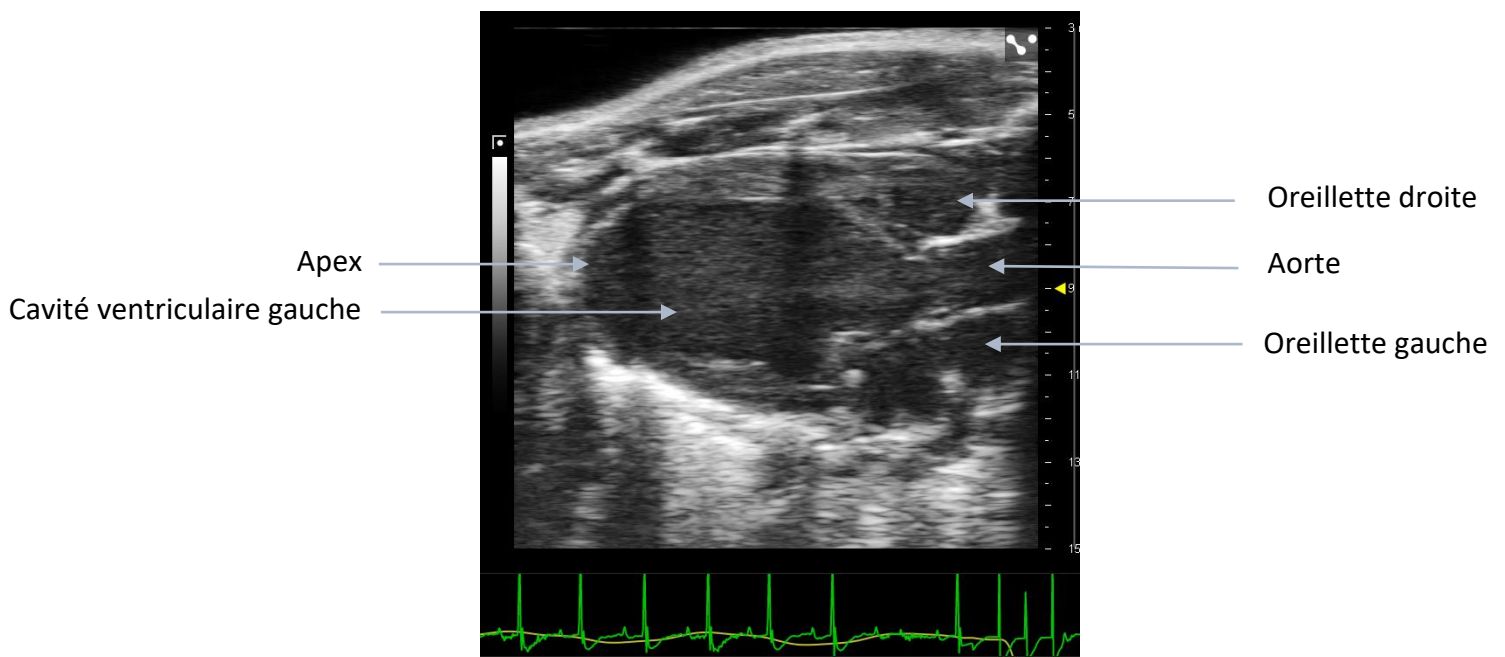


Figure 8 : Visualisation du ventricule gauche en coupe parasternale grand axe en mode luminosité (B-mode).

Image obtenue sur l'électrocardiogramme Vevo 3100 (Fujifilm VISUAL SONICS) avec une sonde 40 MHz.

Tracé vert : électrocardiogramme ; tracé jaune : fréquence respiratoire

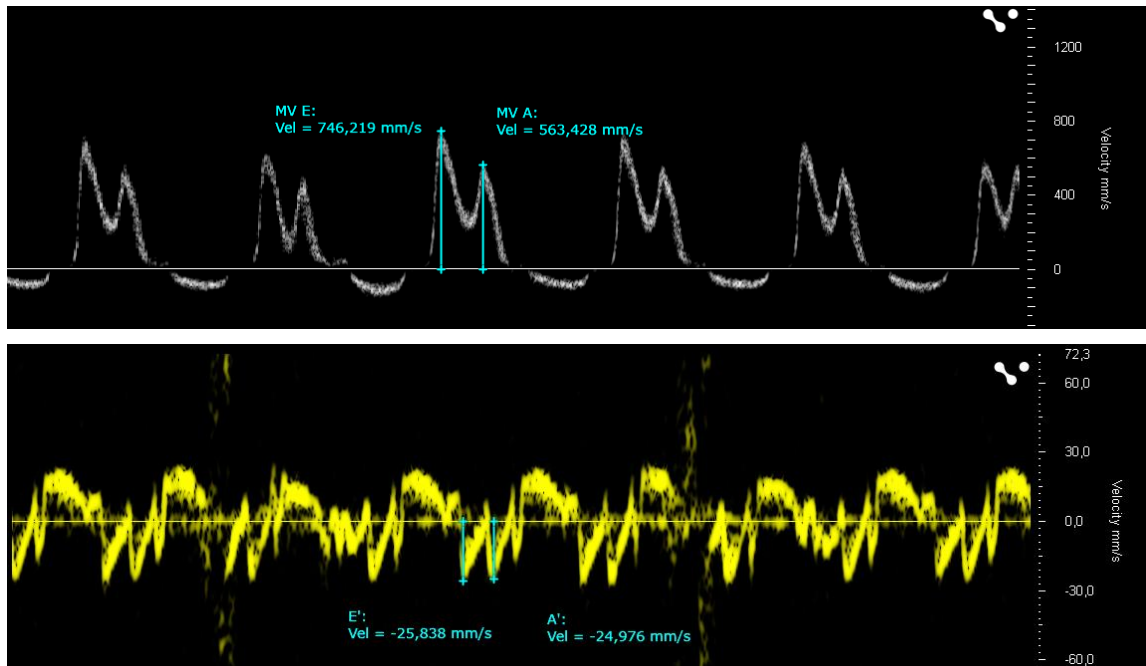


Figure 9 : (A) Enregistrement d'un Doppler pulsé permettant la mesure des ondes E et A représentatives de la fonction diastolique. (B) Enregistrement d'un Doppler tissulaire permettant la mesure des ondes e' et a' représentatives de la fonction diastolique.

MV E : mitral valve E ; MV A : mitral valve A. Images obtenues sur l'électrocardiographe Vevo 3100 (Fujifilm VISUAL SONICS) avec une sonde 40 MHz.

2. Analyse des images

Les images enregistrées ont été analysées sur le logiciel Vevo LAB.

Les différents paramètres de la fonction systolique du ventricule gauche ont été calculés à partir des enregistrements du ventricule en PSGA. Sur chaque enregistrement le contour du ventricule gauche a été tracé manuellement en télésystole et télédiastole sur deux cycles cardiaques consécutifs grâce à l'outil LV trace. A partir de ces tracés, le logiciel a évalué les volumes systoliques (VTS) et diastoliques (VTD) ce qui permet par la suite de calculer les différents paramètres de contractilité :

- Volume d'éjection systolique (VES) (μ l) : $VES = VTD - VTS$
- Fraction d'éjection (FE) (%) : $FE = (VES/VTD) * 100$
- Débit cardiaque (DC) (ml/min) : $DC = VES * (FC/1000)$

Les paramètres de la fonction diastolique ont été mesurés à partir des images Doppler enregistrées. Le Doppler pulsé a permis de mesurer les vitesses des ondes E et A qui correspondent respectivement au remplissage passif et tardif du ventricule gauche. Le Doppler tissulaire a permis de mesurer les vitesses des ondes e' et a' qui renseignent sur la vitesse du mouvement tissulaire du ventricule lors de la phase de relaxation précoce et celle du mouvement tissulaire lors de la contraction de l'oreillette gauche pendant la phase de diastole tardive. A partir de ces valeurs sont calculés les ratios indicateurs de la fonction diastolique du ventricule gauche :

- Le ratio E/A, évalue la fonction diastolique globale
- Le ratio E/e', évalue la pression de remplissage du ventricule gauche

A partir de l'article de Dann et al., une mesure de la taille d'infarctus a été effectuée [203]. En utilisant l'outil de traçage, le contour du ventricule gauche a été mesuré en télédiastole afin de définir la distance totale du VG. Puis, toujours en télédiastole, une seconde mesure de la zone ne présentant aucun mouvement a été faite. Le pourcentage de la taille d'akinésie, considéré comme la taille d'infarctus (TI), a ensuite été calculé avec la formule suivante :

- $TI (\%) = \text{Longueur d'akinésie (mm)} / \text{Longueur totale (mm)} * 100.$

IV. Mesures biochimiques

A. Dosage de la troponine I cardiaque

La troponine I cardiaque circulante a été dosée dans le plasma des souris NA et SA prélevé 24h post-IDM. Le dosage a été effectuée grâce à la technique immuno-enzymatique ELISA avec un kit commercial spécifique (Cloud clone corporation) selon les instructions du fournisseur.

B. Analyse lipidomique

Le plasma des nouveau-nés âgés de 10 jours a été utilisé pour une analyse lipidomique non ciblée, réalisée à la plateforme de métabolomique de l'Institut de Cardiologie de Montréal (Canada). L'extraction des lipides et leur identification nécessaires à l'analyse sont basées sur la technique de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) comme décrit précédemment [204].

V. Histologie

A. Immunofluorescence

La prolifération des cardiomyocytes néonataux a été évaluée grâce à un triple marquage par immunofluorescence à partir d'un protocole du Centre de Génétique de Marseille (MMG) comme décrit précédemment [205].

Les échantillons prélevés ont été fixés dans le PFA 4% pendant 24 h. Ils ont été déshydratés par bains successifs de 2 h dans l'éthanol 70, 90 et 100% respectivement puis clarifiés dans le xylène, un solvant à la fois miscible dans l'éthanol et la paraffine et dans 2 bains de xylène de 1 h. Ils ont ensuite été imprégnés dans 2 bains successifs de 1 h dans la paraffine, orientés de façon longitudinale et mis à sécher une nuit à l'étuve à 37°C. Les échantillons en paraffine ont été coupés à l'aide d'un microtome en coupes fines de 10 µm. Ces coupes ont été déposées sur lame et mises à sécher une nuit à l'étuve à 37°C. Afin de permettre leur marquage, les lames ont été réhydratées par 2 incubations successives de 5 min dans le xylène, des incubations dans l'éthanol de concentrations décroissantes (96% 2 fois 3 min, 90% 1 min) et 5 min dans l'eau distillée. Les lames ont ensuite été incubées dans une tampon citrate de démasquage 15 min à 100°C au bain-marie. Puis après 3 lavages de 5 min dans le PBS (Tampon Phosphate Salin) 1X + Tween 0,05%, une solution de blocage (PBS 1X + 3% BSA) a été déposée et incubée pendant 1h à température ambiante en chambre humide. Après un lavage de 5 min dans le PBS 1X + Tween 0,05%, les lames ont été incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants dilués dans le PBS 1X + 1% BSA : anti-Ki67+ (1 : 100, lapin, Abcam), anti-chaîne lourde de myosine (MHC : Myosin Heavy Chain) (1 : 50, souris, DSHB), anti-agglutinine de germe de blé (WGA : Wheat Germ Agglutinin) couplé à Alexa Fluor™ 555 (1 : 100, Thermo Fisher). Après 3 lavages de 5 min dans le PBS 1X + Tween 0,05%, les anticorps secondaires dilués dans le PBS 1X + 1% BSA suivants ont été déposés : anti-lapin couplé à la CF™680 (1 : 1000, âne, VWR), anti-souris couplé à la CF™568 (1 : 1000, chèvre, VWR). Les lames ont été incubées en chambre humide 1h à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min dans le PBS 1X + Tween 0,05%, les noyaux ont été marqués au DAPI dilué au 1 : 1000 dans du PBS 1X pendant 10 minutes en chambre humide. Enfin, après un lavage de 5 min dans le PBS 1X les lames ont été montées (Fluoromount) et séchées pendant 24 h à 4°C. Les lames marquées ont été observées au microscope à fluorescence Axiomager (Zeiss) à l'aide du logiciel ZEN.

B. Coloration au Rouge Sirius

La fibrose cardiaque par coloration des fibres de collagène a été mise en évidence par coloration au Rouge Sirius et a été réalisée à la plateforme d'histologie Cellimap (INSERM LNC-UMR1231, Dijon, France). Les lames ont été réhydratées par 2 bains de 3 min dans le xylène, des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante (100% 2 fois 3 min et 70% 3 min, puis 3 bains de 3 min dans l'eau courante. Après une incubation de 3 min dans l'eau distillée, les lames ont été incubées dans le Rouge Picosirius pendant 60 min suivi de 4 bains de 10 sec dans l'eau acétifiée. Enfin, les lames ont été incubées dans 2 bains de 10 s d'éthanol 100% et 2 bains de 30 s de xylène. Les lames ont ensuite été montées grâce au baume d'inclusion et observées au microscope à lumière blanche et lumière polarisée Axioscope (Zeiss) à l'aide du logiciel GRYPHAX.

C. Analyse des images

La prolifération des cardiomyocytes a été évaluée grâce au nombre de noyaux positifs au marqueur Ki67 relatif au nombre total de noyaux. 10 à 16 images par cœur ont été analysées. Les cardiomyocytes ont été discriminés des autres cellules avec le marquage de la MHC. La mesure de la taille des cardiomyocytes a été réalisée sur le logiciel ZEN 3.5 (Zeiss). La membrane plasmique a été visualisée grâce au marquage WGA et les cardiomyocytes ont été discriminés des autres types cellulaires avec le marquage de la MHC. 50 à 100 cellules possédant un noyau centré ont été mesurées par image.

L'analyse de la fibrose interstitielle sur des images de tissu cardiaque proche de la zone infarctée a été analysée sur le logiciel Image J. En effet, la surface de tissu total a été calculée grâce aux images en lumière blanche tandis que le calcul de la surface de fibrose a été fait grâce aux images en lumière polarisée. A partir des résultats obtenus par ces deux calculs, le taux de fibrose interstitielle a été calculé en faisant le ratio surface de fibrose/surface de tissu total.

VI. Isolation des cardiomyocytes et RT-PCR en temps réel

A. Isolement des cardiomyocytes

L'isolement des cardiomyocytes des souris de 24 jours a été réalisé par digestion enzymatique grâce à la technique de Langendorff comme décrit précédemment [206]. Après avoir été prélevés, les ventricules ont été perfusés par une solution contenant de la collagénase II (120

U/mL), de la collagénase IV (120 U/mL) et de la protéase XIV (0,05 mg/mL ou 0,175 U/mL) et de la pancréatine (1 mg/ml). Après digestion complète, les cellules cardiaques ont été dissociées, filtrées et récupérées après 25min de sédimentation. Le nombre total de cardiomyocytes a été comptés sur une cellule de Malassez.

B. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits grâce à l'utilisation d'un kit d'extraction (NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel). Les tissus ont été lysés à 4°C dans un réactif d'extraction d'ARN Nucléozol (Macherey-Nagel) à l'aide d'un broyeur-homogénéisateur Precellys® (Bertin Technologies). De l'eau sans RNase a été ajoutée à l'homogénat ensuite centrifugé 15 min à 12 000 g pour séparer les ARN des protéines, de l'ADN et autres contaminants. Le surnageant a été récupéré et mélangé à un tampon MX. Le mélange a été déposé sur une colonne permettant la fixation sélective de l'ARN après centrifugation (8 000 g, 30 s). Deux lavages successifs par le tampon RA3 suivis de centrifugation (8 000 g, 30 s et 8 000 g, 1 min) ont été réalisés. Enfin, une élution par dépôt de 60 µl d'eau sans RNase sur la colonne suivie d'une centrifugation (8 000 g, 2 min) a permis de récupérer les ARN totaux qui ont été conservés à -80°C jusqu'à leur analyse.

La concentration des ARN totaux extraits ont été dosés par spectrophotométrie (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Les ratios 260/280 et 260/230 donnés par l'appareil ont également permis de mesurer la pureté des échantillons.

L'intégrité des ARN a été vérifiée au Bioanalyseur 2100 (Agilent) par migration des ARN sur gel d'agarose et vérification du rapport des ARN 28S/18S.

C. Transcription inverse

La transcription inverse permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir de 1 ng d'ARN totaux extraits a été effectuée grâce au PrimeScript RT reagent kit (Takara Bio Inc.) selon les indications du fournisseur. Les ADNc ont été dilués au 1/10 puis congelés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

D. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (qPCR)

Les expériences qPCR des échantillons cardiaques prélevés 2 mois post-IDM ont été réalisées à l'Université de Lausanne (Suisse) comme décrit précédemment [207].

Les tissus cardiaques de souris néonatales et prélevés 6 mois post-IDM ont été analysés au laboratoire PEC2. 2 µl d'échantillon et un mélange composé de la sonde SYBR Green 2X (Applied Biosystem[®], Life Technologies, USA) et des amorces sens et antisens du gène d'intérêt ont été ajoutés dans une plaque 96 puits, (Applied Biosystem[®], Life Technologies, USA). La liste des gènes analysés est présentée dans le tableau 1.

La réaction de qPCR a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems[®], Life Technologies, Saint-Aubin, France). Les résultats ont été obtenus après 40 cycles comprenant différentes étapes thermiques, une étape initiale de dénaturation à 95°C (15s) suivi d'une élongation à 60°C (1min).

E. Analyse des résultats

Les résultats des qPCR ont été obtenus sous forme de CT (cycle threshold ou cycle seuil). Les valeurs CT ont été normalisées avec un gène de référence, la β-actine ou le 18S, puis ont été analysées grâce à la méthode comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change).

Gène ciblé	Amorce sens (5' to 3')	Amorce anti-sens (5' to 3')
β-actine	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT
18S	ACTTTTGGGGCTTCGTGTC	GCCAGAGACTCATTTCTTCT
ANF	GTGCGGTGTCCAACACAGAT	TCCAATCCTGTCAATCCTACCC
BNP	TTGGGCTGTAACGCACTGAA	TTCAAAGGTGGTCCCAGAGC
Myh7	GCTACGCTTCCTGGATGATCT	CCTCTTAGTGTTGACAGTCTTCC
Troponine T	CAGAGGAGGCCAACGTAGAAG	CTCCATCGGGGATCTTGGGT
Col1α2	GGCCCCCTGGTATGACTGGCT	CGCCACGGGGACCACGAATC
Col1α1	AATGGCACGGCTGTGTGCGA	AACGGGTCCCCTTGGGCCTT
Cycline A2	ATGTCAACCCCGAAAACTG	GCAGTGACATGCTCATCGTT
Cycline B2	AGCTCCAAGGATCGTCCTC	TGTCCTCGTTATCTATGTCTCG
Cycline D1	TGAGAACAAGCAGACCATCC	TGAACTTCACATCTGTGGCA
Cycline E1	GAAAGAAGAAGGTGGCTCCGAC	GTTAGGGGTGGGGATGAAAGAG
Keap1	GGCATCTTGCTTCTTGTGGG	GGAGGCACAGAAGTTAGGTC
Nrf2	CCATTTACGGAGACCCAC	ACACTTCCAGGGGCACT
SIRT1	TTCCACGGTGCTGAGGT	CTTCTAAACTTGGACTCTGGC

Tableau 1 : Amorces utilisées pour la RT-qPCR

VII. Analyses Statistiques

Les résultats sont présentés par la moyenne ± erreur standard à la moyenne (ESM). Les analyses statistiques et les graphes ont été réalisés sur le logiciel Sigma Plot. Pour les analyses statistiques, la normalité et l'homogénéité des variances ont été testées grâce au test de

Shapiro-Wilk et Levene, respectivement. Pour la comparaison entre deux groupes, un test de Student a été réalisé lorsque les conditions pré requises étaient remplies, dans le cas inverse un test non paramétrique de Mann-Whitney a été appliqué. Pour l'analyse de mesures répétées, une ANOVA à deux facteurs et à mesures répétées suivi d'un test post-hoc Holm-Sidak a été effectuée lorsque les conditions de normalité et d'homoscédasticité étaient remplies. Dans le cas contraire, la comparaison entre deux groupes a été réalisée par un test de Student ou de Mann-Whitney. Une valeur $p < 0,05$ était considérée comme significative.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. Article 1

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

À ce jour, les maladies cardiovasculaires restent l'une des principales causes de décès dans le monde et sont fréquemment associées à des comorbidités telles que le surpoids et l'obésité, le diabète de type 2 ou encore l'hypertension artérielle. Expérimentalement, chez le rongeur, un modèle original de syndrome métabolique induit par une suralimentation postnatale (SA) par la réduction de la taille des portées a été développé. Les souris soumises à une SA présentent un surpoids de longue durée, des troubles métaboliques et une susceptibilité accrue aux lésions d'ischémie-reperfusion. Le but de cette étude était d'évaluer l'impact de la SA sur le remodelage cardiaque et le développement d'une insuffisance cardiaque suite à un infarctus du myocarde.

Des souris mâles C57BL/6 ont été élevées dans une portée ajustée à 9 ou 3 petits afin de former le groupe contrôle (groupe NF : normally-fed/ NA : normo-alimenté) et le groupe soumis à une SA (groupe PNOF : postnatally-overfed/ SA : suralimenté), respectivement. Après le sevrage, les souris des deux groupes ont eu accès à une alimentation standard. À l'âge de 4 mois, après une échocardiographie basale, les souris ont été soumises à un infarctus du myocarde expérimental (IDM), par ligature permanente de l'artère interventriculaire antérieure (IVA) gauche ou à une chirurgie sham. Un suivi échocardiographique a été réalisé jusqu'à 2 ou 6 mois après l'opération cardiaque. Après le prélèvement du cœur, la fibrose cardiaque et l'expression de gènes impliqués dans le remodelage et l'insuffisance cardiaque ont été évaluées dans la zone éloignée de l'infarctus et dans la zone infarctée.

À 4 mois, les souris SA présentaient un surpoids significatif par rapport aux souris NA. Ce surpoids était associé à une augmentation de l'aire et du volume télésystolique ainsi qu'une réduction de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) à l'état basal. Toutes les souris soumises à un IDM ont développé une insuffisance cardiaque, observée par l'importante réduction de la FEVG et la dilatation du VG. Deux mois après l'IDM, les souris SA ont démontré une diminution significative du volume d'éjection systolique et une augmentation de la fréquence cardiaque par rapport à leurs valeurs initiales respectives, ainsi qu'une réduction significative du débit cardiaque à 4 mois post-IDM. Après 6 mois, la masse cardiaque et pulmonaire, la coloration de la fibrose et l'expression de l'ARNm des peptides natriurétiques, de l'ANF et du BNP, de la β -MHC et du collagène étaient toutes similaires entre les souris NA-IDM et SA-IDM. Cependant, les souris SA ont montré une diminution de l'expression de la troponine T cardiaque dans la zone infarctée, 2 mois post-IDM et une tendance dans la zone éloignée de l'infarctus, 6 mois post-IDM ($p = 0,0706$). Ainsi, alors que les souris NA ont réussi à

stabiliser la progression de l'insuffisance cardiaque dans un état compensé, les souris SA ont présenté des signes de détérioration de la fonction cardiaque, comme en témoigne la diminution du débit cardiaque, qui pourrait indiquer un signe précoce de décompensation de l'insuffisance cardiaque.

Postnatally overfed mice display increased cardiac function alteration following myocardial infarction

Marie Josse¹, Eve Rigal¹, Nathalie Rosenblatt², Bertrand Collin³, Geoffrey Dogon¹, Luc Rochette¹, Marianne Zeller^{1,4}, Catherine Vergely¹

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

²Division of Angiology, Heart and Vessel Department, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Switzerland

³Preclinical imaging and radiotherapy platform, Centre Georges-François Leclerc and Radiopharmaceutiques, Imagerie, Théranostiques et Multimodalité (RITM) team, Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (ICMUB – UMR CNRS 6302), France

⁴Service de Cardiologie, CHU Dijon Bourgogne, France

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

Abstract:

To date, cardiovascular (CV) pathologies remain one of the main causes of death worldwide and they are commonly associated with comorbidities such as overweight and obesity, type 2 diabetes or hypertension. Experimentally, an original mouse model of metabolic syndrome induced by postnatal overfeeding (PNOF) through litter size reduction after birth was developed. Mice submitted to PNOF show long-lasting overweight, metabolic impairments and increased susceptibility to ischemia-reperfusion injury. The goal of this study was to evaluate the impact of PNOF on cardiac remodelling and heart failure development following myocardial infarction.

C57BL/6 male mice were raised in litter adjusted to 9 or 3 pups for control (normally fed, NF) and PNOF group respectively. After weaning, mice of both groups had free access to standard diet and water. At 4 months, after baseline echocardiography, mice were subjected to experimental myocardial infarction (MI) by left anterior descending artery (LAD) ligation. Echocardiographic follow-up was performed up to 6-months post-surgery. After heart collection, Sirius red staining and RT-qPCR were performed in the remote and infarcted zones. At 4 months, when compared to NF mice, PNOF mice displayed significant overweight. They also showed increased left ventricular end-systolic area (LVESA) and volume (LVESV), and a significant decrease of LV ejection fraction (LVEF) at basal state. After surgery, all mice submitted to MI developed heart failure as shown by LVEF reduction and dilation. PNOF mice demonstrated a significant decreased stroke volume and increased heart rate compared to their respective initial values, 2-months after MI, as well as a significant cardiac output reduction 4-months after MI. After 6-months, cardiac and lung mass, fibrosis staining and mRNA expression of natriuretic peptides, ANF and BNP, of β -MHC and collagen were all similar between the NF-MI and PNOF-MI groups. Nevertheless, PNOF mice showed a trend of cardiac troponin T expression decrease in the remote zone compared to NF mice ($p=0.0706$).

After MI, while NF mice managed to stabilize the heart failure progression in a compensated state, PNOF mice demonstrated signs of cardiac function worsening as evidenced by decrease of cardiac output that could indicate an early sign of heart failure decompensation.

Keywords: Postnatal overfeeding, Myocardial infarction, Heart failure, Echocardiography, Rodents

Introduction

Epidemiological and experimental studies have shown that foetal and postnatal environment is critical for the long-term health in adulthood [1-3]. This concept was named Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) or neonatal programming. It describes that during intra-uterine and early postnatal life, the organism is sensitive to hormonal or nutritional stimuli that can lead to major and sustainable gene expression changes [4]. However, later in life, if the environment does not match the genomic expression, these changes turn out to be inappropriate and can predispose the individual to develop metabolic or cardiovascular (CV) diseases [5, 6].

Experimentally, in rodents, a model of postnatal overfeeding was developed based on litter size reduction after birth. By increasing neonate's nutritional intake due to better milk accessibility, PNOF was shown to induce significant changes in body weight at weaning, persisting later in adulthood [7]. PNOF-induced overweight is also associated with metabolic impairments such as glucose intolerance, insulin resistance and elevated cholesterol and triglycerides contents, describing the symptoms of a metabolic syndrome status [8-11]. Regarding the CV function, PNOF animals display increased cardiac hypertrophy, blood pressure and fibrosis as well as decreased vasodilatory capacities [12-16].

Overweight and obesity-associated metabolic syndrome is a well-recognized risk factor of CV pathologies including myocardial infarction (MI) [17, 18]. Acute MI is caused by the occlusion of a coronary artery leading to ischemia and then to apoptosis and necrosis of cardiac cells due to the loss of blood supply [19]. Cardiomyocytes' death is followed by a wound-healing response that involves an inflammatory phase and the production of collagen for the formation of the fibrotic scar [20-23]. MI is also responsible for multiple cardiac damages including contractile, electrophysiologic and structural alterations, the former involving a remodelling process with myocyte hypertrophy of the non-infarcted zone and dilation of the left ventricle [22, 24]. The post-MI cardiac remodelling process is meant to compensate for the cardiomyocytes' loss and maintain an adequate cardiac output. However, over time it becomes deleterious and give rise to the development of heart failure [24, 25]. Progression towards heart failure comes with the impairment of systolic and/or diastolic function and a gradual loss in the ability to sustain the organism's needs in blood and oxygen leading to clinical symptoms and ultimately death [26].

In previous works, our research team has observed that mice raised in PNOF conditions displayed a higher sensitivity to cardiac stressful challenges such as *ex vivo* ischemia-reperfusion injury [7] and potentially cardiotoxic chemotherapies [27]. We therefore speculated that PNOF may induce a predisposition to the development of post-MI heart failure in adult mice.

The aim of this study was to assess the impact of PNOF on heart failure development after experimentally induced-myocardial infarction in adult mice.

Material and methods

Postnatal overfeeding

All animals received care according to the institution's guidelines. Female and male C57BL6/J mice (Charles River, L'Arbresle, France) were mated in individual cages containing *ad libitum* water and food. Females were separated in individual cages for the duration of gestation and lactation. After birth, on the second day of life, male pups were randomly distributed among mothers to form the two experimental groups: the control group, normally fed (NF), was composed of 9 pups per litter and the overfed group submitted to postnatal overfeeding (PNOF) consisted of 3 pups per litter as reported previously [15]. It was described that 4 months-old PNOF males are more susceptible to ischemia-reperfusion injury compared to PNOF females which is why only males were selected for this study. 24 days after birth, the mice were weaned and chipped to allow their identification. They were gathered in cages with *ad libitum* access to standard food and water.

Experimental protocol

4 months after birth, echocardiography was performed on mice from NF and PNOF groups in order to measure baseline parameters of the cardiac function. Mice were then subjected to *in vivo* cardiac surgery to induce experimental myocardial infarction (MI) or sham-surgery. 2 distinct protocols were adopted (Figure 1). In protocol 1, mice were subjected to MI (NF-MI and PNOF-MI) or to sham-surgery (NF-Sham and PNOF-Sham) and echocardiographic follow-ups were performed with Vevo 770 (Fujifilm VISUAL SONICS, see below) 7 days and then monthly for 2 months after surgery. Mandibular plasma sample was collected 24h after surgery. To investigate heart failure development and its evolution over time, in protocol 2, all mice were subjected to MI and echocardiographic follow-ups were carried out every month for 6 months after surgery with Vevo 3100 (Fujifilm VISUAL SONICS), due to the upgrade of the echograph device. At the end of the protocols, 2- or 6-months after surgery, the left ventricle and the lungs were harvested for weighing in order to measure cardiac mass corresponding to left ventricular mass on tibia length ratio and to evidence signs of pulmonary congestion. The left ventricle was separated into two distinct zones, remote zone (RZ) and infarcted zone (IZ). The cardiac tissues were frozen at -80°C for gene expression study or preserved in 4% PFA to carry out histological analyses.

In vivo cardiac surgery

At 4 months, NF and PNOF mice were submitted to surgically-induced myocardial infarction (MI) by permanent ligation of the left anterior descending artery (LAD). Mice were anesthetized by gaseous anesthesia (isoflurane, induction at 4% and surgery at 2.5%) and intubated for artificial ventilation (VentElite 55-7040, Harvard Apparatus). After intubation, they received an injection of general analgesia (buprenorphine, Buprecare[®], 0.075 mg/kg) and topical anesthesia (lidocaine/prilocaine, Anesderm[®] Ge, 5%). Electrocardiogram (ECG) and body temperature were monitored throughout the whole surgery. After shaving, the thorax was opened and the ribs were spread to expose the heart. An 8-0 silk suture was placed and tightened around the LAD. Elevation of the ST segment on the ECG and whitening of the apex area visually confirmed cardiac ischemia. The rib cage was closed using triple knots with a 5.0 surgical thread. Sham-operated mice underwent a similar surgery without the LAD occlusion. A new injection of Buprecare[®] was made 2 and 24 hours after surgery to maintain analgesic cover.

Echocardiography

Transthoracic echocardiography (TTE) was performed on Vevo 770 or Vevo 3100 devices (Fujifilm VISUAL SONICS), using 30 MHz and 40 MHz high frequency transducers respectively. The mice were anesthetized with gas anesthesia (isoflurane and oxygen 4.5 l/min mixture; induction at 4% and TTE at 2%) and placed in a supine position on a heating pad. Body temperature was monitored with a rectal probe to maintain body temperature between 36 and 37 degrees. The paws were placed on electrodes to measure the physiological parameters, heart and respiratory rates, and ECG. The chest was shaved with depilatory cream. The parasternal long axis view (PSLA) obtained in 2D brightness mode (B-mode) was used to acquire contractile function parameters. Diastolic parameters were acquired with pulsed wave Doppler (PW-Doppler) and tissue Doppler imaging (TDI). Parameters were measured using Vevo Lab software and averaged from 3 cardiac cycles. Left ventricular end-systolic and -diastolic volumes (LVESV and LVEDV) were evaluated from end-systolic and end-diastolic areas (LVESA and LVEDA) measurements allowing calculation of the different contractile parameters:

- Stroke volume (SV) (μ l): $SV = LVEDV - LVESV$

- Ejection fraction (EF) (%): $EF = (SV / LVEDV) * 100$
- Cardiac output (CO) (ml/min): $CO = SV * (HR/1000)$

E and A waves were measured with PW-Doppler and e' and a' waves were measured with TDI for the calculation of E/A ratio and E/e' ratio.

Infarct size (IS) was measured with 2 months post-MI B-mode images as previously described [203]. Briefly, left ventricular total end-diastolic area was traced as well as the akinetic area on the same image. The akinetic percentage, considered as the infarct size, was calculated using the following formula:

$$- IS (\%) = \text{Akinesia length (mm)} / \text{Total length (mm)} * 100.$$

Infarct size measurement enabled the characterization of exclusion criteria. Mice with IS <30% did not show any signs of cardiac function alterations and mice with IS >55% could not complete the entire protocol. As a result, they were excluded from the study.

Cardiac troponin I assay

Circulating cardiac troponin I (cTnI) was measured in NF and PNOF mice plasma collected 24 hours post-MI. The assay was carried out using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a specific commercial kit (Cloud clone corporation) according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR

Gene expression was assessed by RT-qPCR as previously described [29]. Total RNA of 2- and 6-months post-MI heart tissues from NF and PNOF mice was extracted using Macherey-Nagel™ NucleoZOL. cDNA was synthesized using PrimeScript™ RT reagent kit (Takara Bio Inc.) and Polymerase Chain Reactions were performed using the SYBR® Premix Ex Taq™ polymerase (Takara Bio Inc.) and StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Results were obtained after 40 cycles of a thermal step protocol consisting of an initial denaturation of 95°C (15 s), followed by 60°C (1 min) of elongation. The primer sequences are reported in Table 1. Results were obtained as CT values and normalized with the 18S housekeeping gene (Δ CT values). Means of $\Delta\Delta$ CT values were calculated and results were represented as $2^{-\Delta\Delta CT}$ (fold change). Statistics were performed on $\Delta\Delta$ CT individual values. SEM fold increase was calculated using $2^{-\Delta\Delta CT} - 2^{-\text{means of } \Delta\Delta CT}$.

Genes	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
18S	ACTTTTGGGGCTTCGTGTC	GCCCAGAGACTCATTCTTCT
ANF	GTGCGGTGTCCAACACAGAT	TCCAATCCTGTCAATCCTACCC
BNP	TTGGGCTGTAACGCACTGAA	TTCAAAGGTGGTCCCAGAGC
Myh7	GCTACGCTTCCTGGATGATCT	CCTCTTAGTGTTGACAGTCTTCC
Troponin T	CAGAGGAGGCCAACGTAGAAG	CTCCATCGGGGATCTTGGGT
Col1 α 2	GGCCCCCTGGTATGACTGGCT	CGCCACGGGGACCACGAATC
Col1 α 1	AATGGCACGGCTGTGTGCGA	AACGGGTCCCCTTGGGCCTT

Table 1: Primer's sequences

Sirius red staining

Analysis of interstitial cardiac fibrosis in the remote zone was carried out at the Cellimap histology platform (LNC – UMR INSERM 1231, Dijon, France). It was assessed by Sirius red staining of deparaffinized cardiac tissue slides. The slides were observed under a white light and polarized light microscope Axioscope (Zeiss) using the GRYPHAX® software. Analysis of interstitial fibrosis was carried out using Image J software. The total tissue surface area and the fibrosis surface were measured using white light images and polarized light images respectively. The interstitial fibrosis rate was calculated as the ratio of fibrosis surface area on total tissue surface area. Fibrosis rate of each animal corresponded to the average of 5 images and fibrosis rate of each group corresponded to the average \pm SEM of 5 hearts for the NF-MI group and 6 hearts for the PNOF-MI group.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Graphs and statistical analyses were performed on Sigma plot software. For statistical analysis, normality and equal variance were tested using Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. For comparison between two groups, Student's t-test was performed when these assumptions were met, otherwise, Mann-Whitney's test was applied. For data set consisting in repeated measures, Two-Way Repeated Measures ANOVA followed by a Holm-Sidak post hoc analysis was performed when these conditions were met. In other condition, comparison between two groups was realized with a Student's test or a Mann-Whitney's test. A p-value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Body weight

At 4 months of age, body weight of PNOF mice was 15.7% higher than this of NF mice (33.5 ± 0.7 g vs 28.9 ± 0.5 g; $p < 0.05$) (Protocol 1, Figure 2A). Cardiac surgery did not impact significantly mice's body weight in NF-MI and PNOF-MI groups, as MI-operated mice weight did not differ from their respective sham-operated controls, up to 2 months post-surgery.

In the second protocol (Figure 2B), 4-months old PNOF-MI mice body weight was 8.5% increased as compared to NF-MI group (32.5 ± 1.0 g vs 30.0 ± 0.3 g; $p < 0.05$). After cardiac surgery, body weight of PNOF-MI mice stayed significantly higher than this of NF-MI mice at 1-, 4-, 5- and 6-months.

Infarct size

Two months after MI, infarct size (IS) was measured (Figure 3A and B). In protocol 1, it was $41.2 \pm 2.6\%$ and $41.0 \pm 2.5\%$ in NF-MI and PNOF-MI mice respectively (Figure 3A) and in protocol 2, IS was $40.2 \pm 1.8\%$ and $43.0 \pm 2.8\%$ in NF-MI and PNOF-MI mice, respectively (Figure 3B). In both protocols, IS was not significantly different between NF-MI and PNOF-MI groups.

Infarct size was significantly correlated with LVEF (correlation coefficient $r = -0.943$; $p < 0.001$). Mice with infarct size $< 30\%$ or $> 55\%$ were excluded from both protocols (Figure 3C). In each protocol, 3 NF-MI mice and 2 PNOF-MI mice were excluded.

Left ventricular ejection fraction and areas

In protocol 1, when measured with the Vevo 770, pre-surgical LVEF of 4-months old NF and PNOF mice were not different, around 60% (Figure 4A). LVEF of sham mice was not impacted by surgery and was not different between NF-Sham and PNOF-Sham mice through the 2 months of TTE follow-up. In NF-MI and PNOF-MI, LVEF dropped rapidly and was significantly lower 7 days after cardiac surgery compared to sham-operated mice ($32.4 \pm 4.2\%$ and $31.8 \pm 3.5\%$, respectively, corresponding to a 48.8% and 50.6% decrease; $p < 0.001$) and remained low until 2 months.

In protocol 2, when measured with the Vevo 3100, basal LVEF of 4 months-old PNOF mice was significantly lower than this of NF mice ($62.0 \pm 3.0\%$ vs $53.3 \pm 2.7\%$; $p < 0.05$) (Figure 4B). One month after surgery, LVEF from NF-MI and PNOF-MI mice showed a significant decrease compared to their basal state ($32.4 \pm 3.0\%$ and $31.7 \pm 2.8\%$, respectively, corresponding to a 47.7% and 41.6% decrease; $p < 0.001$). Afterwards, LVEF remained low and stable until 6 months post-MI. After surgery, no differences for LVEF between NF and PNOF mice were reported at any time point.

In protocol 1, initial left ventricle end-systolic and end-diastolic areas (LVESA and LVEDA, respectively), did not show any difference between NF and PNOF mice. After surgery, LVESA and LVEDA significantly increased in NF-MI and PNOF-MI mice compared to sham-operated mice, but in a similar amplitude in both groups (Figure 4C and E). LVESA and LVEDA of NF-Sham and PNOF-Sham mice did not vary after surgery and were not different between NF and PNOF mice (Figure 4C and E).

In protocol 2, basal LVESA of PNOF mice, was significantly higher than this of NF mice ($16.3 \pm 2.1 \text{ mm}^2$ vs $13.3 \pm 1.7 \text{ mm}^2$; $p < 0.05$), but after cardiac surgery, LVESA was not different between the two groups (Figure 4D). Regarding LVEDA, no differences were noted between NF-MI and PNOF-MI mice before and after surgery (Figure 4F).

Left ventricular systolic function

Parameters of contractile function of both NF-MI and PNOF-MI mice were monitored before and after cardiac surgery, including heart rate (HR), left ventricle end-systolic and left ventricle end-diastolic volumes (LVESV and LVEDV respectively), stroke volume (SV) and cardiac output (CO) (Protocol 2, Table 1).

Heart rate of PNOF-MI was significantly increased as of 2-months up to 6-months post-MI, while HR of NF-MI mice was only significantly increased at 1-month compared to basal HR.

Regarding left ventricular volumes, basal LVESV was increased in PNOF-MI mice compared to NF-MI mice ($23.6 \pm 3.0 \mu\text{l}$ vs $32.4 \pm 2.2 \mu\text{l}$; $p < 0.05$). After MI, both LVESV and LVEDV of NF-MI and PNOF-MI mice were significantly increased in comparison to basal volumes.

Stroke volume was significantly reduced compared to initial SV in PNOF-MI mice only, at 1-month up to 6-months after-MI.

Cardiac output was significantly decrease at 4-months and showed a trend of decrease at 6-months ($p=0.0899$) compared to basal CO in PNOF-MI mice, but not in NF-MI mice.

Overall, only basal LVESV was different between NF-MI and PNOF-MI mice.

Left ventricular diastolic function

Parameters of diastolic function of NF-MI and PNOF-MI mice were measured before and after surgery including, E wave, A wave, E/A ratio and E/e' ratio (Protocol 2, Table 2).

E wave of NF-MI mice was significantly decreased at 3-, 5- and 6-months compared to initial values and E wave of PNOF-MI mice was only decreased at 1-month compared to basal measurement. No differences were observed between the two groups NF-MI and PNOF-MI.

E/A ratio was significantly decreased at 2-months for NF-MI mice and at 4- and 6-months for PNOF-MI mice.

A wave and E/e' ratio did not show any variations over time between NF-MI and PNOF-MI mice.

Organ mass, interstitial fibrosis and plasma troponin I

After heart withdrawal, the cardiac mass, as well as the ratio of left ventricular mass on tibia length of NF and PNOF mice was evaluated at 2- and 6-months post-surgery (Figure 5A and B).

At the end of the protocol 1, cardiac mass of MI-operated mice was significantly increased as compared to sham-operated mice (Figure 5A).

6 months after-MI, cardiac mass of and NF-MI and PNOF-MI mice was significantly increased as compared to 2-months post-MI (Figure 5B).

Lung mass was measured at 2- and 6-months post-surgery (Figure 5C and D). In protocol 1, no difference was observed neither between MI-operated and sham-operated mice (Figure 5C) nor between NF-MI and PNOF-MI. In protocol 2, lung mass was not different between NF-MI and PNOF-MI mice, however, it was significantly decreased at 6-months compared to 2-months in PNOF-MI mice (Figure 5D).

Evaluation of plasma cardiac troponin I (cTnI) showed elevation of cTnI in MI-operated mice compared to sham-operated mice from both groups, 24 hours after surgery (Figure 5E).

Plasma cTnI level was significantly increased in PNOF-Sham mice compared to NF-Sham mice but it was not different between NF-MI mice and PNOF-MI mice.

Histological analysis was carried out to evaluate the presence of interstitial fibrosis in the remote zone of hearts at 6 months post-MI. Sirius red staining did not show any difference of cardiac collagen deposit between NF-MI and PNOF-MI group (Figure 5F).

Cardiac gene expression

The cardiac expression of genes involved in heart failure, *i.e.* β -MHC, ANF and BNP, cTnT and collagen 1 α 1 and 1 α 2, were measured at 2- and 6-months post-MI in the remote (RZ) and infarcted zone (IZ) of NF and PNOF mice.

At the end of protocol 1, 2 months after surgery, gene expression of BNP in the RZ was significantly increased in PNOF-MI mice as compared to PNOF-Sham mice and ANF gene expression showed a strong trend of increased expression in NF-MI mice as compared to NF-Sham mice ($p=0.0509$) (Figure 6A). In the IZ the expression of ANF and β -MHC was increased in both NF-MI and PNOF-MI mice compared to their sham group. Cardiac expression of BNP was only increased in NF-MI mice compared to NF-Sham mice (Figure 6A). The cardiac expression of collagen 1 α 1 and 1 α 2 was significantly increased in the IZ of NF-MI and PNOF-MI mice compared to sham-operated mice, but not in the RZ (Figure 6B). As for the expression of cardiac troponin T, it was only significantly decreased in PNOF-MI mice compared to PNOF-Sham mice in the IZ and a trend of decreased expression in the RZ ($p=0.055$) (Figure 6C).

Regarding the comparison between NF-MI and PNOF-MI mice, at 2- and 6-months post-MI, there was no difference of β -MHC, ANF and BNP expression (Figure 7A) and collagen 1 α 1 and 1 α 2 expression (Figure 7B) in the RZ or in the IZ. There was no difference of cardiac troponin T expression in the IZ, however, PNOF-MI mice demonstrated a trend of cTnI expression decrease in the RZ compared to NF-MI mice ($p=0.0706$) (Figure 7C),

Discussion

To our knowledge this study was the first to evaluate how a permanent MI, inducing chronic heart failure, may affect distinctly hearts of mice with a metabolic syndrome, “programmed” by postnatal overfeeding, as compared to their control littermates.

Few preclinical experimental models make it possible to explore the multifaceted aspects of CV risk factors as they are encountered in the clinical field. Patients developing post-MI heart failure often have a history of CV diseases, are frequently overweight or obese, hypertensive, display dyslipidaemia, T2 diabetes and are in their middle age [30]. In fact, adult mice which were submitted to a short-term period of overfeeding after birth display long-lasting features of metabolic syndrome with increased risk of cardiac alteration and higher sensitivity to myocardial infarction [13]. Our experimental model differs radically from classical models of diabetic/obese mice induced by genetic mutations (*ob/ob* or *db/db* mouse) or high fat/high sucrose diets, irrelevant from the multidimensional aspects of metabolic syndrome in humans. From the young-adult (4 months) to the old ages (12 months), PNOF mice display overweight with increased adiposity, glucose intolerance/insulin resistance, moderately reduced left ventricular contractility and increased infarct size after experimental myocardial ischemia reperfusion injury [15, 31]. In the present work, we used 4 months-old mature mice and, before cardiac surgery, PNOF mice had an 8% to 15% increase in body weight. This moderate overweight is consistent with previous studies from our group and others, with some differences that could be due to the number of pups per mother or different strains [9, 15, 32, 33]. Body overweight of PNOF mice was not modified after MI-surgery, except transiently, but this could be caused by the small group sizes.

Myocardial infarction was followed by a significant decrease of LVEF in both NF-MI and PNOF-MI as soon as 7 days after-MI, demonstrating the rapid and important deterioration of the systolic function. However, surprisingly, LVEF was not worsened by postnatal overnutrition. We previously highlighted that hearts from PNOF mice or rats showed increased susceptibility to ischemia-reperfusion injury. This higher sensitivity was evidenced by an impaired myocardial contractility after 30 min of ischemia [8, 9, 34] associated with increased infarct size [10, 15, 32], linked to a decreased expression of cardioprotective pathways PI3K/Akt and STAT3 (data under review). Based on these results, we expected to observe a greater

reduction in LVEF in PNOF mice following MI. Regarding other parameters such as LV volumes and areas, MI also induced an increase of LVESA and LVEDA, which are characteristic of contractile dysfunction associated with ventricular dilation. Chamber dilation is a key element of cardiac remodelling and was reported in other studies working on cardiac function evaluation after MI [35-38]. Interestingly, a significant increase of basal LVESA and consequently of basal LVESV in PNOF mice was noticed compared to the NF control group, but likewise LVEF this difference was not maintained after surgery.

Nevertheless, while ejection fraction is one of the mostly used parameters to evaluate cardiac contractile function, other cardiac contraction parameters displayed significant changes. First, we evidenced a significant decrease of stroke volume (SV) associated with a significant heart rate (HR) increase, compared to their initial values, only in PNOF-MI mice. Even though cardiac output (CO) was initially maintained the first 3 months, it was significantly decreased at some point. Stroke volume is determined by contractility, preload and afterload that are in part affected by peripheral vascular tone, blood volume, wall stress or neurohormonal factors [39]. During cardiac remodelling, ventricular dilation, hypertrophy and neurohormonal systems activation such as renin-angiotensin-aldosterone (RAA) or sympathetic nervous (SN) systems, help to maintain stroke volume and cardiac output thanks to preload increase. Vasoconstriction through RAA and SN systems also helps to keep an adequate organ perfusion [40]. However, over time, the overstimulation of these neurohormonal systems can induce sustained vasoconstriction and afterload increase, participating in the heart failure progression [41]. Moreover, increased blood pressure and altered vascular reactivity was previously noticed in PNOF animals [14, 15, 42, 43], and that could be a lead to explain why PNOF mice failed to maintain a stable CO. In addition, it was previously reported that PNOF animals display renal dysfunction [44, 45] as well as altered contractile response to angiotensin II and gene expression changes of the RAAS components, in the kidney [46] and the heart [34].

Interestingly, 2-months after MI, the expression of cardiac troponin T was only decreased in PNOF-MI compared to PNOF-Sham, in the IZ and showed a trend of decrease expression in the RZ. At 6-months, a trend of decreased expression of cTnt was also observed in the RZ of PNOF-MI mice compared to NF-MI mice. Such a reduction could be underlying cardiac cell death in the hearts of PNOF-MI mice and be responsible for a decreased myocardial

contractility. It was previously demonstrated that PNOF rat hearts display reduced contractility *ex vivo* and that it was associated with increased expression of the apoptotic marker caspase 8 [34]. Therefore, an increase of cardiomyocyte death within the heart of PNOF mice could play a role in the SV reduction through reduced cardiac contractility.

As observed in previous studies [36, 38, 47], the cardiac expressions of ANF and BNP genes were increased in the IZ of both NF-MI and PNOF-MI mice as compared to sham mice, 2 months after surgery. During heart failure progression, natriuretic peptides, ANF and BNP, are also expressed because of their vasodilatory, diuretic and natriuretic actions. These two genes as well as β -MHC are mostly expressed during the foetal period but a phenomenon of “foetal gene reprogramming” is observed in heart failure. As for adverse cardiac remodelling, this process is considered detrimental for the heart [48, 49] but the comparison of cardiac mRNA expression between NF-MI and PNOF-MI mice did not show any differences at 2- and 6-months in the two zones.

The LV mass on tibia length ratio, at 2- and 6-months, was not different between the PNOF-MI and NF-MI groups, as well as the hypertrophic marker β -MHC. Interstitial fibrosis staining and collagen mRNA expression in the remote and infarcted zones were also similar in NF-MI and PNOF-MI mice. Previous studies reported higher cardiac hypertrophy and fibrosis in hearts of PNOF mice and rats compared to controls [9, 14-16, 50, 51]. However, none of them were performed in a context of post-MI cardiac remodelling where the heart structure is known to be completely rearranged [52].

Surprisingly, lung mass of PNOF-MI mice was decreased at 6-months compared to 2-months post-MI, which is not coherent with the increasing lung mass usually observed in heart failure as a sign of pulmonary oedema. However, it was reported that C57Bl6 mice strain do not show features of lung congestion after MI as compared to other strains [53].

Finally, it is worth mentioning that we observed different results concerning prior-surgery LVEF in mice in the two distinct protocols. While LVEF of 4-months old mice were around 60%, no differences were noticed in protocol 1 whereas in the second protocol, LVEF was nearly 10% decreased in PNOF mice as compared to NF. This observation is in opposition with previous results showing that LVEF is not altered in adult PNOF animals such as 3 months-old rats or 4 months-old mice [14, 15] but is reduced in aged PNOF mice of 6- and 7-months old

[15, 32]. This difference might be explained by the higher performance of Vevo3100 as echocardiographic device used for the protocol 2, vs Vevo770 used for the protocol 1. TTE follow-up performed on Vevo770 device with a 30 MHz transducer, was not able to reveal any basal LVEF difference between PNOF and NF mice, even though the sample size was bigger, giving greater statistical power. On the contrary, a 10% reduction of basal LVEF was observed in PNOF mice compared to NF mice, measured on Vevo3100 device with a 40 MHz transducer. Cardiac imaging on small animal models such as rabbits, rats or mice presents two major challenges, the small cardiac size and the elevated heart rate (> 500 bpm). First, the development of high-frequency ultrasound transducers (> 20 MHz) allowed precise and high-quality images, even for small-sized organs [54]. In mice, cardiac images obtained with a 40 MHz transducer have a better resolution compared to 30 MHz [55]. Second, in order to correctly observe and analyse the cardiac cycle with high heart rate, the software must be able to process a large number of images per second or image frequency. The frame rates of Vevo770 device was 100 Hz (100 images per second) while Vevo3100 device had a 199 Hz frame rates. Therefore, the improvements obtained on the second protocol, realized after upgrading the echograph device in our laboratory, enabled a better acquisition of the cardiac cycle evidencing basal LVEF difference between PNOF and NF mice.

In conclusion, this study evidenced for the first time the increased cardiac sensitivity to adverse cardiac remodelling following myocardial infarction. After MI, while NF-MI mice managed to stay in a compensated heart failure, PNOF-MI mice demonstrated an aggravation of their cardiac function, initially through SV decrease followed by CO decrease as of 4-months post-MI. Even though, other mechanisms could be involved and remain to be investigated, this higher cardiac sensitivity could be in part linked to an increased myocardial cell death leading to a decreased cardiac contractility and an early sign of heart failure decompensation.

Acknowledgments

The authors gratefully thank Ivan Porcherot and Sandy Guner for technical assistance, and Marie Thauvin for her involvement in histological experiments. The authors also gratefully thank Gilles Renault and his team for the lend of a 30 MHz transducer.

Funding

This work was supported by the Association de Cardiologie de Bourgogne, and by grants from the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté, the French Ministry of Research and Education, the University of Burgundy, the Fédération Française de Cardiologie and the Fondation de France. This work was supported by the “Délégation Régionale Académique à la Recherche et à l'innovation” (DRADI) through the CPER IDATHERAP project (n° BFCO-SR-P541).

Author contributions

MJ, EV and NR performed the experiments and analysed the data. CV and MJ wrote the manuscript. CV, MZ, NR and BC corrected the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Legends to figures

Table 2: Evolution of systolic function parameters of NF-MI and PNOF-MI mice up to 6 months post-MI (Protocol 2; n = 5 and 6 respectively).

Results are expressed as mean \pm SEM. *: significantly different from basal NF-MI mice ($p < 0.05$); +: significantly different from basal PNOF-MI mice ($p < 0.05$), Two-Way Repeated Measures ANOVA, Student or Mann-Whitney's test. HR, heart rate; LVESV, left ventricular end-systolic volume; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LV SV, left ventricular stroke volume; LV CO, left ventricular cardiac output.

Table 3: Evolution of diastolic function parameters of NF-MI and PNOF-MI mice up to 6 months post-MI (Protocol 2; n = 5 and 6 respectively).

Results are expressed as mean \pm SEM. *: significantly different from basal NF-MI mice ($p < 0.05$); +: significantly different from basal PNOF-MI mice ($p < 0.05$), Two-Way Repeated Measures ANOVA, Student or Mann-Whitney's test.

Figure 1: Schematic view of the experimental protocols.

After birth, new-born mice were distributed in NF group composed of 9 pups per litter or PNOF group composed of 3 pups per litter. At 24 days old, mice were weaned and given standard diet for the rest of the protocol. At 4 months old, basal echocardiography (TTE) was performed followed by *in vivo* cardiac surgery. In protocol 1, mice were submitted to sham or myocardial infarction and TTE follow-ups were carried out up to 2 months after surgery on echograph Vevo 770. In protocol 2, mice were submitted to myocardial infarction and TTE follow-ups were performed up to 6 months post-MI on echograph Vevo 3100. At the end of both protocols, heart and lungs were harvested for analyses. NF, normally fed group; PNOF: postnatally overfed group; TTE, transthoracic echocardiography.

Figure 2: (A) Body weight evolution of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice (Protocol 1). (B) Body weight evolution of NF-MI and PNOF-MI mice (Protocol 2).

*: significantly different from NF-Sham mice ($p < 0.05$). **: significantly different from NF-MI mice ($p < 0.05$), Two Way Repeated Measures ANOVA.

Figure 3: (A) Infarct size of NF-MI and PNOF-MI mice measured 2 months post-surgery on echograph Vevo 770 (Protocol 1). (B) Infarct size of NF-MI and PNOF-MI mice measured 2 months post-surgery on echograph Vevo 3100 (Protocol 2). (C) Regression plot of correlation between LVEF and IS of NF-MI and PNOF-MI measured 2 months post-MI and exclusion criteria (Protocol 1 and 2).

Figure 4: (A) LVEF evolution of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice (Protocol 1). (B) LVEF evolution of NF-MI and PNOF-MI mice (Protocol 2). (C) LVESA evolution of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice (Protocol 1). (D) LVESA evolution of NF-MI and PNOF-MI mice (Protocol 2). (E) LVEDA evolution of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice (Protocol 1). (F) LVEDA evolution of NF-MI and PNOF-MI mice (Protocol 2).

*: significantly different from NF mice ($p < 0.05$), †: significantly different from PNOF mice ($p < 0.05$), Two-Way Repeated Measures ANOVA, Student or Mann-Whitney's test. LVEF, left ventricular ejection fraction; LVESA, left ventricular end-systolic area; LVEDA, left ventricular end-diastolic area.

Figure 5: (A) Cardiac mass represented as left ventricular mass on tibia length ratio of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI at 2 months post-surgery (Protocol 1). (B) Cardiac mass represented as left ventricular mass on tibia length ratio of NF-MI and PNOF-MI mice at 6-months post-MI (Protocol 2). (C) Lung mass of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI at 2 months post-surgery (Protocol 1). (D) Lung mass of NF-MI and PNOF-MI at 6 months post-MI (Protocol 2). (E) Circulating cardiac troponin I assay of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI at 24 hours post-surgery. (F) Cardiac interstitial fibrosis rate in the remote zone of NF-MI and PNOF-MI 6 months post-MI (Protocol 2).

* ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$): significantly different, Student or Mann-Whitney's test. LV mass: left ventricular mass.

Figure 6: Cardiac mRNA expression of NF-Sham, NF-MI, PNOF-Sham and PNOF-MI mice at 2 months post-surgery (Protocol 1), in the remote and the infarcted zone (A) β -MHC, ANF and BNP (B) Collagen 1 α 1 and 1 α 2 (C) Cardiac troponin T.

Results are expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) over the levels of NF-Sham and PNOF-Sham.

* ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); *** ($p < 0.001$): significantly different, Student or Mann-Whitney's tests. ANF, Atrial Natriuretic Factor; BNP, Brain Natriuretic Peptide; β -MHC, β -Myosin Heavy Chain; Col1 α 1, collagen 1 α 1; Col1 α 2, collagen 1 α 2; cTnT, cardiac troponin T; RZ, remote zone; IZ, infarcted zone.

Figure 7: Cardiac mRNA expression of NF-MI and PNOF-MI mice at 2- and 6-months post-MI (Protocol 1 and 2), in the remote and infarcted zone (A) β -MHC, ANF and BNP (B) Collagen 1 α 1 and 1 α 2 (C) Cardiac troponin T.

Results are expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) over the levels of NF-MI. ANF, Atrial Natriuretic Factor; BNP, Brain Natriuretic Peptide; β -MHC, β -Myosin Heavy Chain; Col1 α 1, collagen 1 α 1; Col1 α 2, collagen 1 α 2; cTnT, cardiac troponin T; RZ, remote zone; IZ, infarcted zone

Table 2

	HR (b.p.m)		LVESV (μ l)		LVEDV (μ l)		LV SV (μ l)		LV CO (ml/min)	
	NF	PNOF	NF	PNOF	NF	PNOF	NF	PNOF	NF	PNOF
Basal	403 \pm 22	396 \pm 14	23.6 \pm 3.0	32.4 \pm 2.2*	60.9 \pm 4.2	69.2 \pm 3.6	37.2 \pm 2.2	36.7 \pm 1.7	15.0 \pm 1.0	14.7 \pm 1.1
M1	494 \pm 24*	445 \pm 24	62.4 \pm 9.9*	69.3 \pm 8.4*	90.6 \pm 11.3*	99.4 \pm 9.1*	28.2 \pm 3.4	30.0 \pm 1.6*	13.6 \pm 1.6	13.4 \pm 1.0
M2	452 \pm 17	473 \pm 15*	68.7 \pm 6.9*	71.7 \pm 10.9*	99.0 \pm 6.9*	100.9 \pm 12.5*	30.6 \pm 2.4	29.2 \pm 2.0*	13.8 \pm 1.0	13.9 \pm 1.1
M3	453 \pm 17	465 \pm 18*	73.3 \pm 9.9*	82.0 \pm 10.8*	103.3 \pm 9.9*	109.6 \pm 10.9*	30.2 \pm 2.5	27.5 \pm 0.8*	13.6 \pm 1.1	12.9 \pm 0.7
M4	442 \pm 12	450 \pm 12*	75.1 \pm 8.7*	87.9 \pm 10.9*	106.5 \pm 7.6*	113.5 \pm 11.1*	31.4 \pm 2.8	26.0 \pm 1.7*	13.9 \pm 1.2	11.6 \pm 0.6*
M5	438 \pm 13	485 \pm 24*	88.4 \pm 11.2*	90.5 \pm 12.4*	122.5 \pm 10.9*	115.8 \pm 13.0*	33.8 \pm 2.2	25.5 \pm 2.2*	14.9 \pm 0.9	12.3 \pm 1.3
M6	436 \pm 17	452 \pm 13*	82.9 \pm 9.8*	95.5 \pm 13.6*	115.3 \pm 8.3*	121.5 \pm 14.1*	32.2 \pm 6.1	26.3 \pm 2.2*	14.0 \pm 2.7	11.9 \pm 1.0

Table 3

	E wave		A wave		E/A ratio		E/e'	
	NF	PNOF	NF	PNOF	NF	PNOF	NF	PNOF
Basal	748 ± 31.0	734 ± 15.0	594 ± 46.1	548 ± 33.3	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.1	33.5 ± 1.0	32.9 ± 1.2
M1	688 ± 58.9	566 ± 26.8 ⁺	639 ± 20.1	507 ± 41.8	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	34.5 ± 8.1	45.0 ± 5.1
M2	657 ± 33.6	672 ± 24.9	630 ± 61.0	651 ± 46.4	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	43.1 ± 7.4	41.8 ± 8.0
M3	552 ± 60.9*	625 ± 51.9	528 ± 69.5	499 ± 49.3	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.2	34.8 ± 4.3	30.2 ± 3.2
M4	575 ± 39.5	615 ± 32.5	552 ± 15.6	581 ± 37.5	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1 ⁺	37.8 ± 2.6	40.7 ± 2.2
M5	547 ± 29.2*	616 ± 9.5	535 ± 37.7	431 ± 69.7	1.0 ± 0.0*	1.4 ± 0.2	44.3 ± 4.5	42.1 ± 7.1
M6	468 ± 81.7*	566 ± 46.5	509 ± 43.3	600 ± 19.8	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1 ⁺	36.8 ± 4.4	37.8 ± 6.0

Figure 1

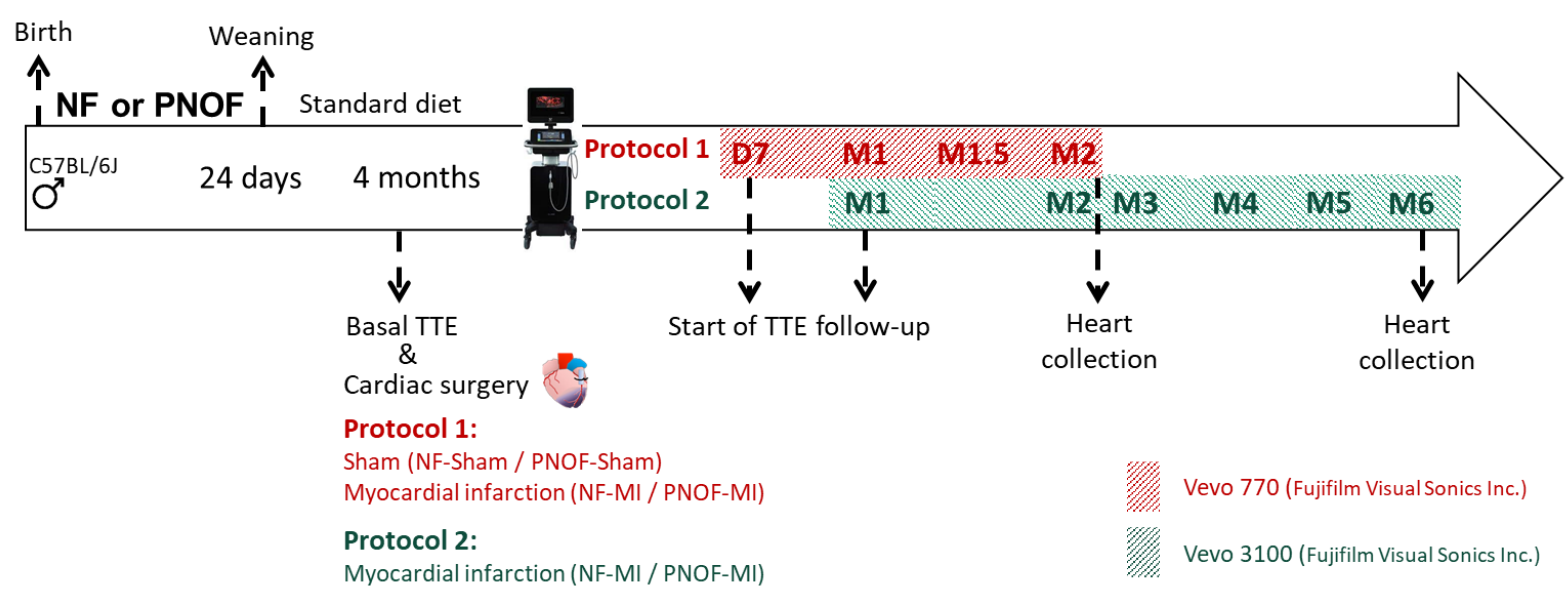


Figure 2

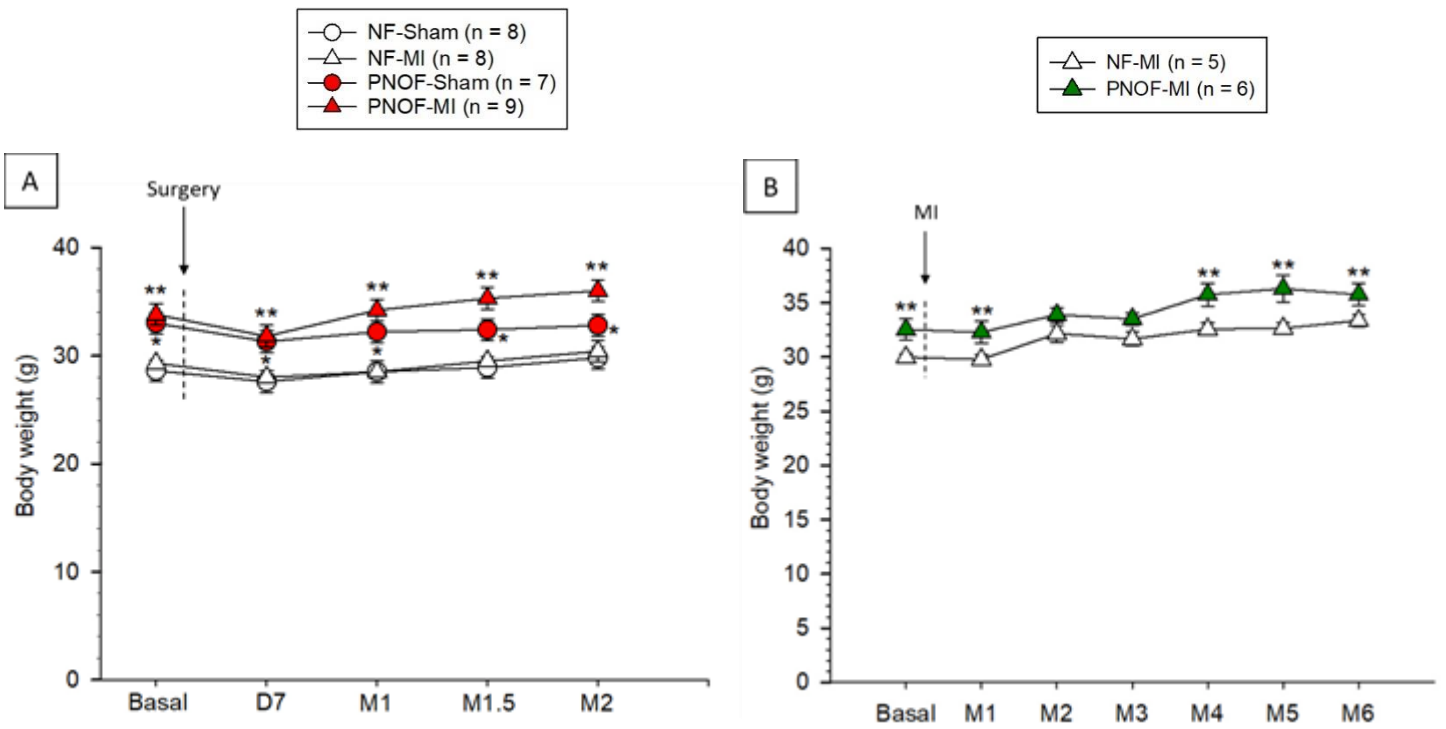


Figure 3

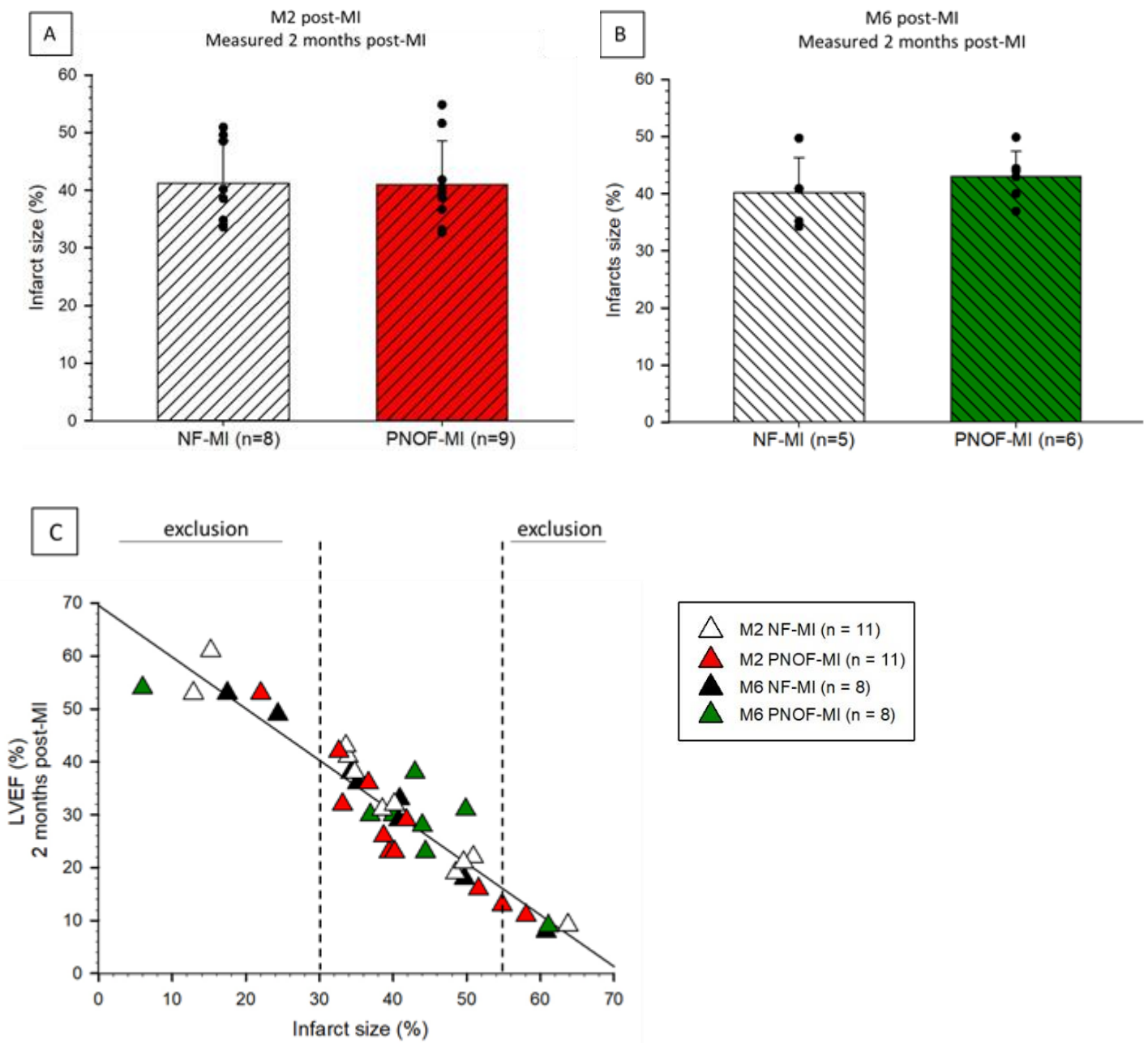


Figure 4

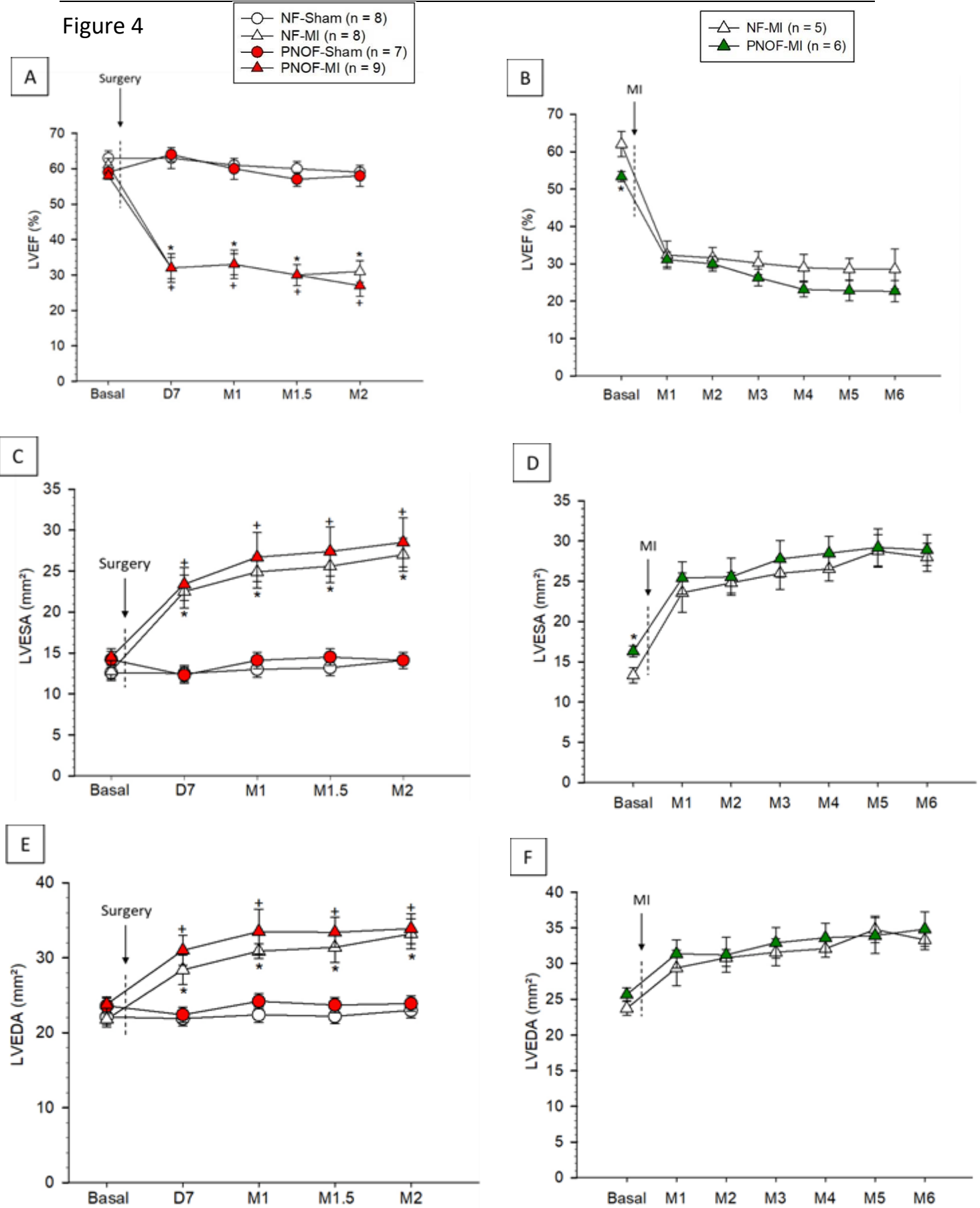


Figure 5

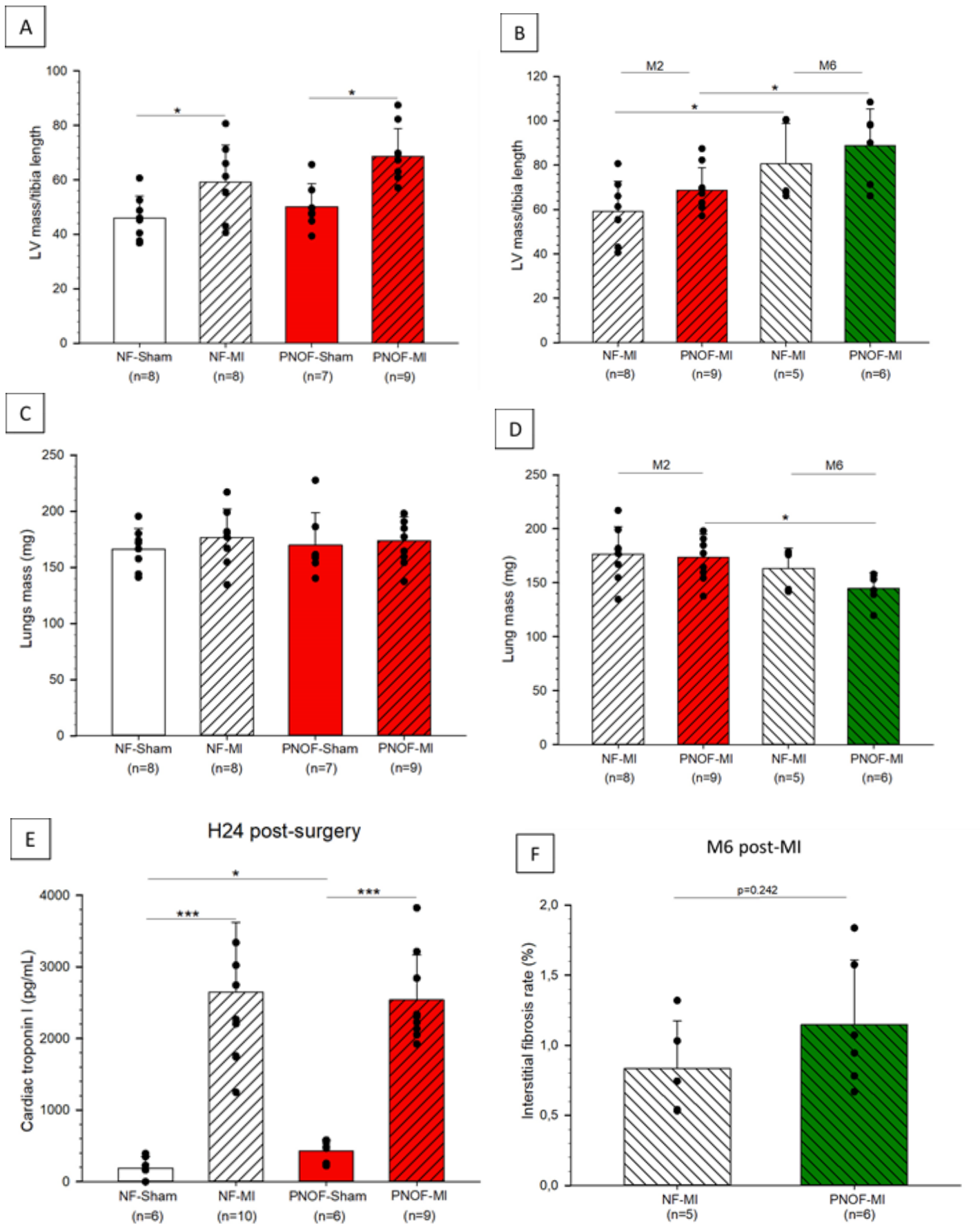


Figure 6

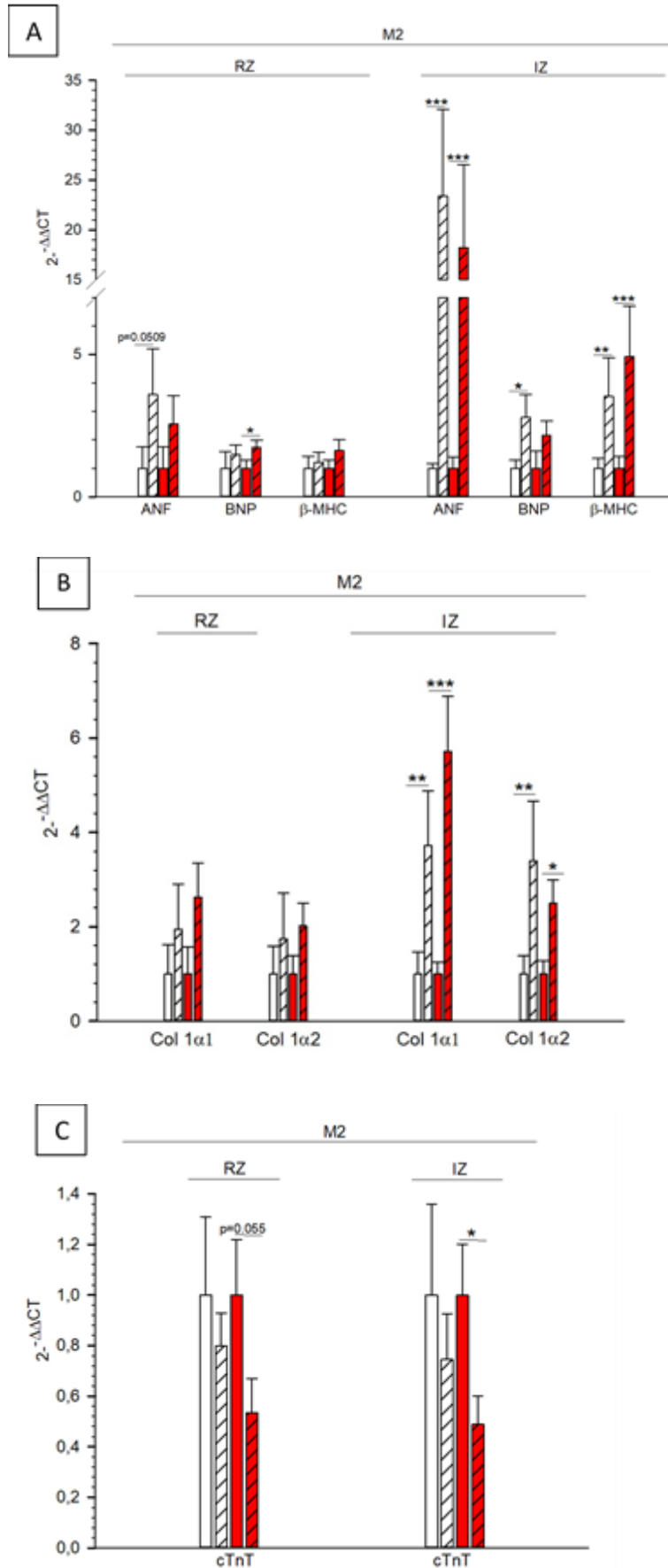
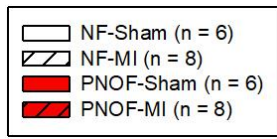
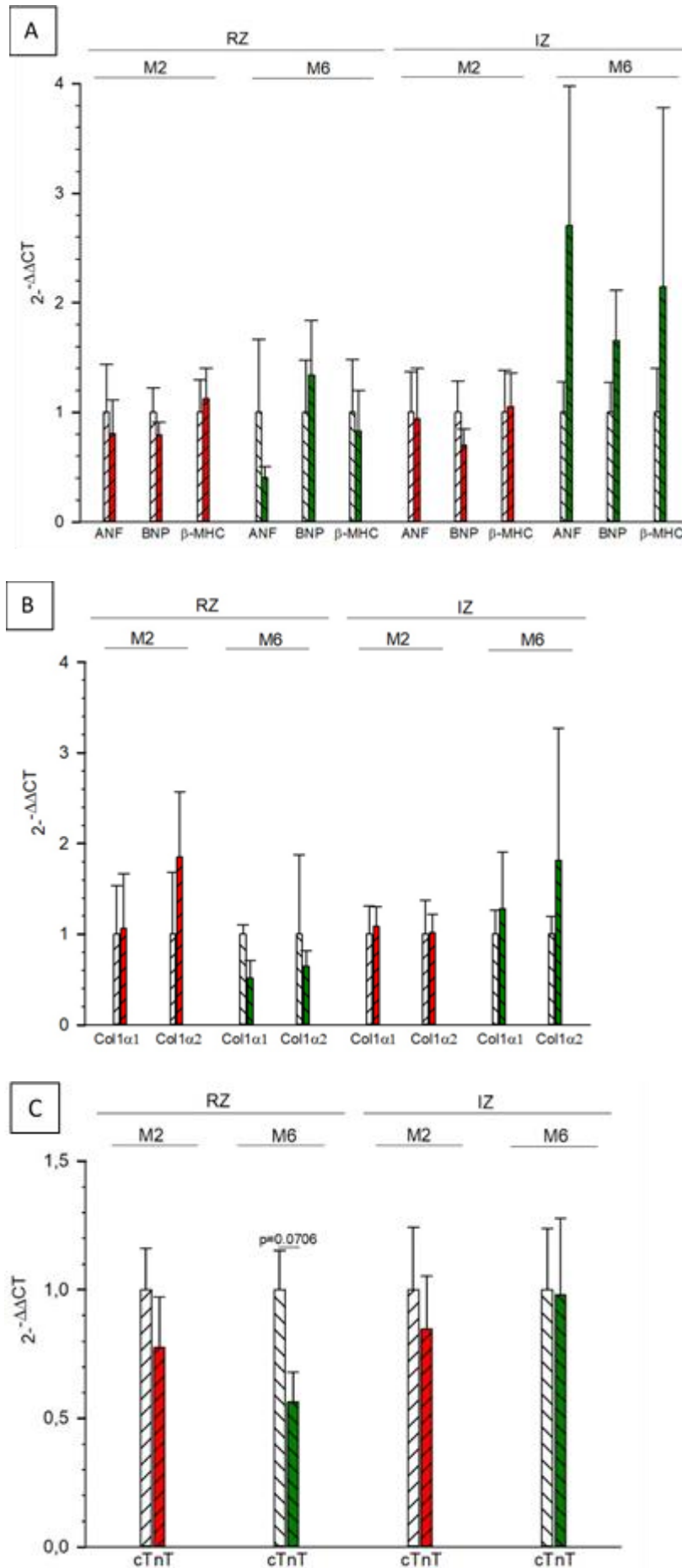
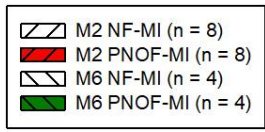


Figure 7



References

1. Godfrey, K.M., et al., *Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017. **5**(1): p. 53-64.
2. Yan, J., et al., *The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis*. BMC Public Health, 2014. **14**: p. 1267.
3. Gniuli, D., et al., *Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny*. J Lipid Res, 2008. **49**(9): p. 1936-45.
4. King, S.E. and M.K. Skinner, *Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity Susceptibility*. Trends Endocrinol Metab, 2020. **31**(7): p. 478-494.
5. Gluckman, P.D., M.A. Hanson, and T. Buklijas, *A conceptual framework for the developmental origins of health and disease*. J Dev Orig Health Dis, 2010. **1**(1): p. 6-18.
6. Arima, Y. and H. Fukuoka, *Developmental origins of health and disease theory in cardiology*. J Cardiol, 2020. **76**(1): p. 14-17.
7. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences*. J Nutr, 2013. **143**(5): p. 553-62.
8. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood*. Biochimie, 2012. **94**(1): p. 117-24.
9. Vieira, A.K., et al., *Overnourishment during lactation induces metabolic and haemodynamic heart impairment during adulthood*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2015. **25**(11): p. 1062-9.
10. de Moura Freitas, C., et al., *Mitochondrial impairment following neonatal overfeeding: A comparison between normal and ischemic-reperfused hearts*. J Cell Biochem, 2019. **120**(5): p. 7341-7352.
11. Sanchez-Garcia, G., L. Del Bosque-Plata, and E. Hong, *Postnatal overnutrition affects metabolic and vascular function reflected by physiological and histological changes in the aorta of adult Wistar rats*. Clin Exp Hypertens, 2018. **40**(5): p. 452-460.
12. Gonzalez-Hedstrom, D., et al., *Overfeeding During Lactation in Rats is Associated with Cardiovascular Insulin Resistance in the Short-Term*. Nutrients, 2020. **12**(2).
13. Josse, M., et al., *Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
14. Junior, M.D.F., et al., *Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats*. Life Sci, 2019. **226**: p. 173-184.
15. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56981.
16. de Araujo, G.A., et al., *Overweight during lactation and its implications for biometric, nutritional and cardiovascular parameters of young and adult male and female rats*. J Nutr Sci, 2020. **9**: p. e27.
17. Csige, I., et al., *The Impact of Obesity on the Cardiovascular System*. J Diabetes Res, 2018. **2018**: p. 3407306.
18. Mottillo, S., et al., *The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(14): p. 1113-32.
19. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. Circulation, 2018. **138**(20): p. e618-e651.
20. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
21. Oliveira, J.B., A. Soares, and A.C. Sposito, *Inflammatory Response During Myocardial Infarction*. Adv Clin Chem, 2018. **84**: p. 39-79.
22. Gajarsa, J.J. and R.A. Kloner, *Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities*. Heart Fail Rev, 2011. **16**(1): p. 13-21.

23. Venugopal, H., et al., *Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction*. Cells, 2022. **11**(9).
24. Galli, A. and F. Lombardi, *Postinfarct Left Ventricular Remodelling: A Prevailing Cause of Heart Failure*. Cardiol Res Pract, 2016. **2016**: p. 2579832.
25. Dhalla, N.S., et al., *Cardiac remodeling and subcellular defects in heart failure due to myocardial infarction and aging*. Heart Fail Rev, 2012. **17**(4-5): p. 671-81.
26. Snipelisky, D., S.P. Chaudhry, and G.C. Stewart, *The Many Faces of Heart Failure*. Card Electrophysiol Clin, 2019. **11**(1): p. 11-20.
27. Guenancia, C., et al., *Overweight in mice, induced by perinatal programming, exacerbates doxorubicin and trastuzumab cardiotoxicity*. Cancer Chemother Pharmacol, 2016. **77**(4): p. 777-85.
28. Dann, M.M., et al., *Quantification of murine myocardial infarct size using 2-D and 4-D high-frequency ultrasound*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2022. **322**(3): p. H359-H372.
29. Bon-Mathier, A.C., et al., *Brain Natriuretic Peptide Protects Cardiomyocytes from Apoptosis and Stimulates Their Cell Cycle Re-Entry in Mouse Infarcted Hearts*. Cells, 2022. **12**(1).
30. Tune, J.D., et al., *Cardiovascular consequences of metabolic syndrome*. Transl Res, 2017. **183**: p. 57-70.
31. Souza, L.L., E.G. Moura, and P.C. Lisboa, *Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring*. Nutrients, 2022. **14**(10).
32. Li, N., et al., *Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 30817.
33. Collden, G., E. Caron, and S.G. Bouret, *Neonatal leptin antagonism improves metabolic programming of postnatally overnourished mice*. Int J Obes (Lond), 2022. **46**(6): p. 1138-1144.
34. Granado, M., et al., *Long-term effects of early overnutrition in the heart of male adult rats: role of the renin-angiotensin system*. PLoS One, 2014. **8**(6): p. e65172.
35. Kanno, S., et al., *Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction*. J Am Soc Echocardiogr, 2002. **15**(6): p. 601-9.
36. Bayat, H., et al., *Progressive heart failure after myocardial infarction in mice*. Basic Res Cardiol, 2002. **97**(3): p. 206-13.
37. Benavides-Vallve, C., et al., *New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41691.
38. Sam, F., et al., *Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(1): p. H422-8.
39. Bruss, Z.S. and A. Raja, *Physiology, Stroke Volume*, in StatPearls. 2023: Treasure Island (FL).
40. Tanai, E. and S. Frantz, *Pathophysiology of Heart Failure*. Compr Physiol, 2015. **6**(1): p. 187-214.
41. Hartupee, J. and D.L. Mann, *Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction*. Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(1): p. 30-38.
42. Achard, V., et al., *Immediate Postnatal Overfeeding in Rats Programs Aortic Wall Structure Alterations and Metalloproteinases Dysregulation in Adulthood*. Am J Hypertens, 2016. **29**(6): p. 719-26.
43. Juvet, C., et al., *Renal Programming by Transient Postnatal Overfeeding: The Role of Senescence Pathways*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 511.
44. Yim, H.E., et al., *Overweight, hypertension and renal dysfunction in adulthood of neonatally overfed rats*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(7): p. 1324-33.
45. Boubred, F., et al., *Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(4): p. F943-51.

-
46. Granado, M., et al., *Effects of early overnutrition on the renal response to Ang II and expression of RAAS components in rat renal tissue*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2017. **27**(10): p. 930-937.
 47. Fujisue, K., et al., *Colchicine Improves Survival, Left Ventricular Remodeling, and Chronic Cardiac Function After Acute Myocardial Infarction*. *Circ J*, 2017. **81**(8): p. 1174-1182.
 48. Taegtmeyer, H., S. Sen, and D. Vela, *Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1188**: p. 191-8.
 49. van der Pol, A., et al., *Cardiac foetal reprogramming: a tool to exploit novel treatment targets for the failing heart*. *J Intern Med*, 2020. **288**(5): p. 491-506.
 50. Chavaglia Cavalet, L., et al., *Long-term effects of early overfeeding and food restriction during puberty on cardiac remodeling in adult rats*. *J Dev Orig Health Dis*, 2020. **11**(5): p. 492-498.
 51. Bernardo, A.F., et al., *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*, 2016. **29**: p. 124-32.
 52. Wu, Q.Q., et al., *Mechanisms contributing to cardiac remodelling*. *Clin Sci (Lond)*, 2017. **131**(18): p. 2319-2345.
 53. van den Borne, S.W., et al., *Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2009. **84**(2): p. 273-82.
 54. Zacchigna, S., et al., *Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function*. *Cardiovasc Res*, 2021. **117**(1): p. 43-59.
 55. Wang, L.W., et al., *High-Frequency Echocardiography - Transformative Clinical and Research Applications in Humans, Mice, and Zebrafish*. *Circ J*, 2018. **82**(3): p. 620-628.

II. Article 2

Article en cours de préparation dont les expérimentations devront être complétées avant soumission à un journal d'audience internationale

Peu après la naissance, les cardiomyocytes perdent leur capacité à proliférer pour évoluer vers une croissance hypertrophique et cette capacité proliférative est connue pour être influencée par des facteurs nutritionnels. Alors que le glucose favorise la prolifération des cardiomyocytes, l'augmentation de l'utilisation des acides gras par le cœur induit leur maturation. La suralimentation postnatale (SA) induite par la réduction de la taille des portées chez le rongeur reproduit l'impact de la surnutrition infantile, et s'est avérée altérer le métabolisme et la fonction cardiaque sur le long terme. Cependant, les effets de la SA à court terme restent encore méconnus. L'objectif de ce projet était d'étudier les changements métaboliques et cardiaques précocement induits par la SA.

Des nouveau-nés mâles C57BL/6 ont été élevés dans une portée ajustée à 9 ou 3 petits pour former un groupe contrôle (NF : normally-fed/ NA : normo-alimenté) et un groupe soumis à une SA (PNOF : postnatally-overfed/ SA : suralimenté), respectivement. 7, 10 ou 24 jours après la naissance, le cœur et le plasma ont été collectés afin de réaliser des analyses histologiques et de lipidomique ou encore pour étudier l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réponse antioxydante.

À 7, 10 et 24 jours, le poids corporel et la masse cardiaque des nouveau-nés SA étaient significativement plus élevés que ceux des témoins NA. À 7 jours, le taux de prolifération des cardiomyocytes dans les cœurs de souris SA était significativement diminué et associé à une hypertrophie cardiaque accrue, par rapport aux cœurs des nouveau-nés contrôles. De ce fait, au sevrage, le nombre de cardiomyocytes était significativement diminué dans les cœurs de souris SA. Étonnamment, l'analyse lipidomique a montré une diminution des taux de triglycérides chez les nouveau-nés SA, 10 jours après la naissance. Enfin, au sevrage, l'expression cardiaque des facteurs Keap1 et sirtuin1, impliqués dans la réponse antioxydante, était modifiée. Il semblerait donc que la SA raccourcisse la fenêtre de prolifération des cardiomyocytes et induise leur maturation. Des altérations métaboliques précoces pourraient être mises en jeu ; néanmoins, des analyses complémentaires nécessitent d'être réalisées. Étant donné leur grande diversité, de composition et de rôle, il serait dans un premier temps nécessaire de déterminer la nature des différents acides gras composant les triglycérides modifiés par la SA. Il serait également intéressant d'explorer la composition du lait maternel des portées de taille réduite, pour comprendre l'origine des changements lipidiques observés chez les nouveau-nés SA. Ces résultats devraient ainsi permettre de mieux comprendre les conséquences précoces de la SA ainsi que les mécanismes impliqués.

Postnatal overfeeding in mice induces early metabolic changes and impacts cardiac proliferation.

Marie Josse¹, Eve Rigal¹, Nathalie Rosenblatt², Francesca Rochais³, Marianne Zeller¹, Catherine Vergely¹

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

²Division of Angiology, Heart and Vessel Department, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois and University of Lausanne, Switzerland

³Marseille Medical Genetics, Campus Hospitalo-universitaire de la Timone, Marseille, France

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

Abstract:

Shortly after birth, cardiomyocytes lose their ability to proliferate to switch towards a hypertrophic growth and this ability is known to be influenced by nutritional factors. Postnatal overfeeding (PNOF) induced by litter size reduction in rodents reproduces the impact of childhood overnutrition and was shown to alter long-term metabolism and cardiac function in adulthood. However, little is known about its short-term impact. Our goal was to investigate the early metabolic and cardiac changes induced by PNOF.

C57BL/6 male pups were raised in litter adjusted to either 9 or 3 pups to form normally fed (NF) or postnatally overfed (PNOF) group, respectively. At 7, 10 or 24 days after birth, hearts and plasma were collected for immunostaining, lipidomic analysis, RTqPCR and cardiomyocyte isolation.

At 7, 10 and 24 days, body weight and cardiac mass of PNOF pups were significantly higher than NF controls. At 7 days, the proliferation rate of cardiomyocytes in PNOF hearts was significantly decreased, associated with an increased hypertrophy, resulting in the reduction of cardiomyocyte number at weaning. Surprisingly, lipidomic analysis showed a decreased of triglyceride levels in PNOF pups 10 days after birth. At weaning, the cardiac expression of factors, Keap1 and sirtuin1, involved in antioxidant response was modified.

In conclusion, PNOF shortened the cardiomyocyte proliferative window and induced early cardiomyocyte maturation. Further metabolic and maternal milk analyses are being carried out to better understand the causes.

Keywords: Perinatal programming, Postnatal overfeeding, Rodents, Heart, Cardiomyocyte proliferation

Introduction

Obesity and overweight have drastically increased over the past 4 decades worldwide [1] as well as their prevalence among children and adolescent [2, 3]. It is now well recognized that neonatal life, including foetal and immediate postnatal period, is critical for the organism development [4]. According to this concept, known as Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) or neonatal programming, toxic or altered hormonal and nutritional signals can affect organ structure and function predisposing to the development of metabolic and cardiovascular diseases later in life [5-7].

Postnatal overfeeding (PNOF) induced by litter size reduction in rodents is a relevant animal model to study the long-term impact of increased nutritional intake during the first weeks after birth [8, 9]. In adult rats and mice, it was shown to induce permanent overweight associated to increased adiposity, elevated leptin and circulating lipids levels as well as metabolic alterations such as glucose intolerance and insulin resistance [10-13]. PNOF is also associated to cardiovascular changes [14]. It was previously demonstrated by our team that adult mice originating from PNOF litters display elevated cardiac oxidative stress and fibrosis, altered left ventricular function and increased sensitivity to myocardial ischemia-reperfusion injury [15, 16].

Mammals' heart is the first functionally formed organ during embryogenesis and, for a long time, it was believed to be a post-mitotic organ unable to proliferate and regenerate. However, studies in rodents demonstrated that postnatal cardiomyocytes still have the capacity to proliferate [17, 18], however this ability is lost within 3 to 7 days after birth [18-20]. This postnatal proliferative short window is followed by a transition to hypertrophic growth where cardiomyocytes increase their size allowing myocardial maturation [21, 22]. Concomitantly, after birth, the heart metabolism switches from anaerobic glycolysis (with glucose as a main energy source) to oxygen-dependent mitochondrial oxidative phosphorylation fuelled by fatty acids oxidation [23, 24]. This switch is believed to be due to the transition from a relatively hypoxic foetal environment to an oxygen-rich atmosphere at birth that enables mitochondrial maturation [25, 26]. Many studies evaluated the impact of metabolic substrate variations on cardiomyocyte proliferation and maturation demonstrating that glycolytic metabolism is associated with cardiomyocyte proliferation [27, 28] whereas

fatty acids oxidation promotes cell maturation [29]. Moreover, inhibition of fatty acid metabolism was shown to extend the postnatal cardiomyocytes' proliferative window [30] while, recently, it was reported that γ -linolenic acid, a fatty acid present in the milk of mice mothers would be responsible for cardiomyocyte maturation [31]. Therefore, metabolic changes in the postnatal critical window could directly influence cardiomyocyte fate during heart development.

In light of the early metabolic changes observed in postnatally overfed mice, the aim of this study was to investigate the impact of PNOF on postnatal cardiomyocyte proliferation at different stages of lactation, in relationship with their nutritional metabolic status.

Material and methods

Postnatal overfeeding model

All animals received care according to the institution's guidelines. Adult C57BL6/J female mice (Charles River, L'Arbresle, France) were mated with male mice in individual cages and given water and standard pellets *ad libitum* during pregnancy and lactation. On the second day after birth, male pups were randomly distributed among mothers for cross-fostering and litter sizes were adjusted to either 9 male pups for normal feeding (NF group) or 3 male pups in order to induce postnatal overfeeding (PNOF group).

Heart and plasma collection

7, 10 or 24 days after birth (D7, D10 and D24 respectively), mice were weighted and euthanized by cervical dislocation. Hearts were rapidly harvested, rinsed in a 3M KCl solution and weighted. Hearts were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for paraffin embedding and immunostaining. Cardiac mass corresponding to heart mass to tibia length ratio was calculated.

Intracardial plasma was collected at D10 mice and frozen in liquid nitrogen for lipidomic analysis.

Immunostaining

Heart samples embedded in paraffin were sectioned in 10 µm thickness slices. After deparaffinization and rehydration, antigen unmasking was performed in boiling citrate-based buffer solution and blocked 1 h at room temperature in PBS-BSA 3%. Sections were then washed in 1X PBS-Tween 0.05% and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in PBS-BSA 1%: anti-Ki67 (rabbit, 1/100, Abcam), anti-Myosin heavy chain (MHC) (mouse, 1/50, DSHB), anti- Wheat Germ Agglutinin (WGA) conjugated to Alexa Fluor 488 (1/100, Thermo Fisher), anti-cleaved caspase 3 (rabbit, 1:100, Ozyme). The sections were subsequently washed in 1X PBS Tween 0.05% and incubated with corresponding secondary antibodies: anti-mouse conjugated to Alexa Fluor 568 (donkey, 1/1000, VWR) and anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 680 (mice, 1/1000, VWR). DAPI was used for nuclear staining.

Microscope and data analyses

Images were acquired with Axio Imager microscope (Zeiss) and analyses were performed on ImageJ for nuclei counting and ZEN software 3.5 (Zeiss) for immunostaining measurements.

Cardiomyocyte size measurement

Cardiomyocytes cross-sectional area was assessed on ZEN software 3.5 (Zeiss). Plasma membrane was visualized using WGA staining and cardiomyocytes were discriminated from other cell types with MHC staining. 50 to 100 cells per image with a centered nucleus and a circular membrane were measured. Cardiomyocyte size was the average \pm SEM of 4 hearts for the normal fed condition and 5 hearts for the overfed condition.

Proliferation analysis

To assess cardiomyocyte proliferation, the number of Ki67 positive nuclei relative to the total number of Hoechst-positive nuclei was counted from 10 to 16 images per heart. Cardiomyocytes (CMs) were discriminated from other cell types (non-cardiomyocytes: NCMs) with MHC staining. Measurements were the average of 4 hearts for the normal fed condition and 5 hearts for the overfed condition.

Cardiomyocyte isolation

At D24, CMs isolation was performed using the Langendorff-Free method as previously described [207]. Briefly, mice were killed and the heart perfused with enzymatic solution containing collagenase II (120 U/mL), collagenase IV (120 U/mL) and protease XIV (0.05 mg/mL or 0.175 U/mL). After complete digestion of the heart, cardiac cells were dissociated, filtered and collected after 25 min sedimentation. Total cardiomyocyte number was counted on Malassez counting chamber.

Quantitative RT-PCR

Cyclin, Nrf2, Keap1 and SIRT1 gene expression was assessed by RT-qPCR. Total RNA was extracted from NF and PNOF isolated cardiomyocytes or heart tissue of D24 mice using TRI-Reagent (Zymo Research, Orange County, CA, USA). cDNA was synthesized using PrimeScript RT reagent kit (Takara Bio Inc.) and Polymerase Chain Reactions were performed using the SYBR Premix Ex Taq polymerase (Takara Bio Inc.) and ViiATM7 Instrument (Applied Biosystems).

Results were obtained after 40 cycles of a thermal step protocol consisting of an initial denaturation of 95 °C (1 s), followed by 60 °C (20 s) of elongation. The primer sequences are reported in Table 1. All results were normalized with the 18S or β -actin housekeeping gene (Δ CT values). Means of $\Delta\Delta$ CT values were calculated and results were represented as $2^{-\Delta\Delta CT}$ (fold change). Statistics were performed on $\Delta\Delta$ CT individual values. SEM fold increase was calculated using $2^{-\Delta\Delta CT} - 2^{-\text{means of } \Delta\Delta CT}$.

Gene	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
β -actin	AGCTGCGTTTTACACCCTTT	AAGCCATGCCAATGTTGTCT
18S	ACTTTTGGGGCTTCGTGTC	GCCCAGAGACTCATTCTTCT
Cyclin A2	ATGTCAACCCCGAAAACTG	GCAGTGACATGCTCATCGTT
Cyclin B2	AGCTCCAAGGATCGTCCTC	TGTCCTCGTTATCTATGTCCTCG
Cyclin D1	TGAGAACAAGCAGACCATCC	TGAACTTCACATCTGTGGCA
Cyclin E1	GAAAGAAGAAGGTGGCTCCGAC	GTTAGGGGTGGGGATGAAAGAG
Keap1	GGCATCTTGCTTCTTGTGGG	GGAGGCACAGAAGTTAGGTC
Nrf2	CCATTTACGGAGACCCAC	ACACTTCCAGGGGCACT
SIRT1	TTCCACGGTGCTGAGGT	CTTCTAAACTTGGACTCTGGC

Table 1 : Primer's sequences

Lipidomic analysis

Plasma from 10 days-old mice was used for untargeted lipidomic analysis at the metabolomic platform of Institut de Cardiologie, Montréal, Canada. Lipids extraction and identification was carried out based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry technic (LC-MS/MS) as previously described [34].

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Graphs and statistical analyses, Student's t-test and Mann-Whitney test, were performed on Sigma plot software with a p-value < 0.05 considered statistically significant.

Results

Effect of PNOF on body and cardiac weight

Body weight from PNOF juvenile mice was 16% higher at D7 as compared to NF mice (PNOF vs NF mean \pm SD: 4.8g \pm 0.1 vs 4.2g \pm 0.1; $p < 0.01$). This increase was maintained at D10 and D24 to an even bigger extent with a difference of 22% and 42% higher respectively (D10: 5.9g \pm 0.2 vs 4.8g \pm 0.1; D24: 15.4g \pm 0.5 vs 10.8g \pm 0.4; $p < 0.001$) (Figure 1A).

Cardiac mass, corresponding to heart mass to tibia length ratio, was also significantly increased at D7, D10 and D24 ($p < 0.01$) (Figure 1B).

Cardiomyocyte number and cyclin genes expression at weaning

At weaning (D24), PNOF mice demonstrated a 25% reduction in the total number of CMs per mg of tissue as compared to control group (PNOF vs NF mean \pm SD: 16447 \pm 1141 vs 21938 \pm 1217) (Figure 2A)

A decreased in mRNA expression of cyclin D1 and A2 was also observed in CM at D24, without significant changes in cyclin E1 and B2 (Figure 2B).

Nrf2/Keap1 pathway and Sirtuin 1 at weaning

At weaning (D24), Keap1 gene expression was significantly decreased in PNOF heart mice compared to NF mice, while Nrf2 cardiac expression was not different between the two groups (Figure 3A). SIRT1 cardiac expression was significantly increased in PNOF hearts at weaning (Figure 3B).

Effect of PNOF on postnatal cardiomyocyte proliferation and maturation

Immunostaining of the proliferation marker Ki67 was performed at D7, D10 and D24 in order to assess postnatal cardiac proliferation. Cardiomyocytes were discriminated from other cell types using MHC staining (Figure 4A).

At D7, PNOF juvenile mice showed a 66 % reduction of CMs proliferation as compared to their NF controls but no difference of NMCs proliferation (Figure 4B). At D10 and D24, there was no difference of proliferation between PNOF and NF mice (Figure 4B).

This decrease of CMs proliferation was associated with a 22.7% increase of CMs cross-sectional area in PNOF as compared to NF juvenile mice (PNOF vs NF mean \pm SD: $82.2 \mu\text{m}^2 \pm 8.9$ vs $67.0 \mu\text{m}^2 \pm 6.7$); $p < 0.05$) (Figure 4C) as visualized by the Gaussian curve shift of PNOF CMs size distribution (Figure 4D).

At D7, apoptosis was evaluated using cleaved caspase 3 antibody but no apoptosis was observed in the hearts of the two groups (data not shown).

Effect of PNOF on juvenile mice lipid profile and lipidome

The untargeted lipidomic analysis revealed early changes of circulating lipid profile in PNOF juvenile mice as compared to NF juvenile mice. The volcano plot of 1184 features, obtained following mass spectrometry (MS) data processing, shows the downregulation of triglycerides and the upregulation of phosphatidylcholine and cholesterol derivatives in PNOF mice, using p-value corrected < 0.015 (y axis) and fold change > 1.3 (x axis) (Figure 5).

Discussion

In this study we demonstrated that overfeeding by litter size reduction immediately after birth leads to early metabolic and cardiac structure modifications.

Pups raised in small litters showed a significantly higher body weight only few days after litter size reduction associated with a rise of cardiac mass. These increases were maintained up to weaning and were even more pronounced. It was already reported that PNOF animals show early elevation of body weight and signs of enlarged heart with increased heart weight on tibia length ratio [35-37]. Cardiac hypertrophy was also evidenced by a 50% cardiomyocyte area augmentation in PNOF rats at weaning [36]. In this study, we also noticed an increase of cardiomyocyte cross-sectional area in D7 PNOF hearts, indicating that hypertrophy starts very early after the induction of PNOF.

In addition, we observed a decrease of staining for the proliferation marker Ki67 in cardiomyocytes of D7 PNOF hearts, but not in the other cell types, showing that PNOF affects specifically postnatal cardiomyocyte proliferation. As a consequence, a decrease of total cardiomyocyte number per mg of heart tissue was observed in PNOF mice at weaning which was linked to a reduction of cyclin D1 and A2 mRNA cardiomyocyte expression.

After birth, cardiomyocytes still have the ability to proliferate before transitioning to cardiac maturation by hypertrophic growth [38]. This cardiomyocyte proliferative window can be influenced by substrate utilization. It was reported that *in vitro* and *in vivo* inhibition of carnitine palmitoyltransferase (CPT1), which plays a role in mitochondrial fatty acid uptake, leads to a decrease of fatty-acid oxidation, associated with a delayed cell-cycle exit and decreased hypertrophic growth [39]. On the contrary, treatment with a PPAR α agonist promoted fatty-acid oxidation and increased cardiomyocyte maturation and enlargement [39]. Another study evaluated the consequences of various glucose concentration on foetal cardiomyocytes at different stages of differentiation *in vitro* [27]. The results revealed that a treatment with high glucose concentration induced higher mitosis by upregulation of genes involved in mitosis and cell cycle regulation and reduced cardiomyocyte maturation.

PNOF was shown to induce metabolic disorders, including elevated triglycerides, cholesterol and total lipids, associated with mitochondrial dysfunction in 21 to 30-days-old PNOF rodents [35, 37, 40]. However, information regarding cardiac and metabolic impairments in young

animals, before weaning, are limited. A study evaluated the plasma triglyceride levels of 7-, 14- and 21-days old PNOF rats and observed that triglyceride concentration was only increased at 14 days-old [41]. Analyses on D7 NF and PNOF pups are being carried out to investigate total cholesterol, HDL- and LDL-cholesterol, triglycerides and glucose levels. Hepatic enzyme levels of alanine aminotransferase (ALAT) and aspartate aminotransferase (ASAT) will also be measured.

Interestingly, lipidomic analysis of D10 neonates showed that PNOF group displayed a downregulation of circulating triglycerides with an upregulation of phosphatidylcholines and cholesterol derivatives. Whether it is caused by higher storage and/or utilization or decreased supply is not clear yet. Moreover, the untargeted analysis did not bring precise information regarding the types of fatty acids that are modified. It is well described that short-, medium- and long-chain fatty acids play different roles in the organism [42, 43]. For that reason, a targeted lipidomic analysis will be performed to investigate more precisely the lipid changes observed in PNOF neonates and their implication in organ function and metabolism.

After birth, it is believed that the cell cycle exit is mediated by reactive oxygen species (ROS) produced by mitochondrial oxidation [44]. It would be interesting to study mitochondrial carbohydrate and fatty acid oxidation in neonate hearts to better understand the involvement of the different metabolic substrates and the mechanisms involved in reduced cardiomyocyte proliferation.

In addition, the study of Nrf2/Keap1 pathway demonstrated a decreased gene expression of Keap1 in PNOF hearts compared to NF hearts at D24. In case of elevated oxidative stress in the cell, Keap1 releases Nrf2 which, in turn, activates the transcription of antioxidant enzymes genes [45]. Even though Nrf2 expression was not different in PNOF hearts, this suggests that the oxidative balance might be disturbed in PNOF hearts. The expression of SIRT1 was also more elevated in PNOF hearts which appears to be involved in antioxidant defences as well [46, 47]. Gonzalez *et al.* showed the presence of increased oxidative state associated with increased antioxidant enzyme expression in the hearts of overfed rats at weaning [40]. Therefore, interest in the mitochondrial machinery might be key in the understanding of metabolic and oxidative processes altered by PNOF in the myocardium.

Maternal milk composition might also play a role in PNOF induced-cardiomyocyte maturation. Cardoso *et al.* demonstrated that neonate mice fed with maternal milk deficient in fatty acids had a prolongation of the cardiomyocyte proliferative window, with an increased total number of cardiomyocytes at weaning, and a decreased cardiomyocyte size [30]. Recently, γ -linolenic acid, present in maternal milk, was demonstrated as a key component of cardiomyocyte maturation. This fatty acid is a ligand of retinoic X receptors (RXR) that drive the expression of fatty acid oxidation genes, leading to mitochondrial maturation in cardiomyocytes [31]. Maternal milk was shown to be modulated by postnatal overfeeding. Milk composition from mothers raising small litters exhibits increased energetic value induced by higher fat and triglyceride contents with or without decreased protein content [41, 48, 49]. These changes are observed early, on the 7th day after birth, and are maintained until the 21st day of lactation. Complementary analyses are currently being run in order to investigate the maternal milk composition of mothers raising small and normal litters, 7 days after birth.

Finally, due to their various roles on proliferation at different stages of cardiac development, complementary analyses of mRNA expression on neonatal isolated cardiomyocytes are going to be performed to see if other proliferative parameters are modified such as the transcription factor Foxo3, cyclins and cyclin-dependant kinases (CDKs), cyclin-dependent-kinase inhibitors (CKIs) p27 and p21 and the Hippo pathway factors, YAP and TAZ [50, 51].

In conclusion, we evidenced that PNOF is responsible for early cardiac and metabolic alterations that can be observed a few days after birth. These results still need to be completed to better understand the origins and consequences of those early changes that could play a role in the long-term cardio-metabolic impairments observed in adult PNOF mice.

Funding, Acknowledgments

This work was supported by the Association de Cardiologie de Bourgogne, and by grants from the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté, the French Ministry of Research and Education, the University of Burgundy, the Fédération Française de Cardiologie and the Fondation de France.

The authors would like to gratefully thank Tom PERROT, Marion BOUVET, Nikola PETROVIC and Sandy GUNER for their contribution on this project. They also thank the Laboratory “Cognition, Action et Plasticité Sensorimotrice” (Inserm - U1093) for the access to the microtome.

Author contributions

MJ, EV and NR performed the experiments and analysed the data. CV and MJ wrote the manuscript.

Legend to figures

Figure 1: PNOF juvenile mice demonstrate early overweight associated to heart hypertrophy

(A) NF and PNOF body weight at D7, D10 and D24 (n = 6 per group). Results are expressed as mean ± SEM. ** p<0.01; *** p<0.001, Student's test.

(B) NF and PNOF heart weight/tibia length ratio at D7, D10 and D24 (n = 6 per group). Results are expressed as mean ± SEM. ** p<0.01; *** p<0.001, Student's test.

Figure 2: CM number is decreased at D24 in hearts of PNOF mice associated with decreased cyclin genes expression

(A) Total CMs number per mg of tissue in NF and PNOF hearts at D7 and D24 (n = 4 and 6 per group, respectively). Results are expressed as mean ± SEM. *** p<0.001, Student's test.

(B) mRNA expression coding for cyclin genes D1, E1, A2 and B2 analysed in isolated CMs from NF and PNOF mice at D24 (n = 6 per group). Results are expressed as fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$) over the levels of NF expression. * p<0.05; Student's Test.

Figure 3: Cardiac Nrf2/Keap1 pathway is disturbed in PNOF mice at weaning

(A) mRNA expression coding for Nrf2 and Keap1 analysed in hearts from NF and PNOF mice at D24 (n = 10 and 12, respectively). Percentage of PNOF hearts related to NF hearts. * p<0.05; Student's Test.

(B) mRNA expression coding for Sirtuin 1 analysed in hearts from NF and PNOF mice at D24 (n = 10 and 12, respectively). Percentage of PNOF hearts related to NF hearts. * p<0.05; Student's Test. SIRT1, Sirtuin 1.

Figure 4: Hearts of PNOF juvenile mice have a decrease in CM proliferation at D7, associated with increased cell size

(A) Representative images of immunostaining for proliferation detection. Positive cardiomyocytes for Ki67+ (pink arrow) were discriminated from positive non-myocytes Ki67+ (yellow arrow). WGA, Wheat Germ Agglutinin; MHC, Myosin Heavy Chain.

(B) Percentage of cardiomyocytes expressing the proliferative marker Ki67 in NF and PNOF hearts at D7 (n = 4 and 5, respectively) D10 and D24 (n = 6 per group). Percentage of PNOF hearts related to NF hearts. * $p < 0,05$; Student's test. CMs, cardiomyocytes.

(C) Percentage of non-cardiomyocytes expressing the proliferative marker Ki67 in NF and PNOF hearts at D7 (n = 4 and 5, respectively) D10 and D24 (n = 6 per group). Percentage of PNOF hearts related to NF hearts. * $p < 0,05$; Student's test. NCMs, non-cardiomyocytes.

(D) Cardiomyocytes cross-sectional area in D7 NF and PNOF juvenile mice (n = 4 and 5 respectively). Results are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0,05$; Student's test.

(E) Gaussian curve of CMs cross-sectional area distribution of NF and PNOF juvenile mice at D7 (n = 4 and 5 respectively, 50 to 100 images analysed per animal).

Figure 5: PNOF juvenile mice display changes in lipid profile including decreased triglycerides and increased phosphocholines

Volcano plot from LC-QTOF-based untargeted lipidomics of plasma from NF and PNOF juvenile mice at D10 (n = 12 per group) showing 1184 features obtained following MS data processing from which lipids were annotated using previously acquired data set. The x axis corresponds to fold changes (FCs) of MS signal intensity values for all these features in PNOF mice vs. NF mice (\log_2) and the y axis to P values ($-\log_{10}$). Using p-value corrected < 0.015 and $FC > 1.3$, decreased features (red dots corresponding to TG) and increased features (yellow, orange, beige and blue dots corresponding to LPC, PC, CE and cholesterol derivatives, respectively) were discriminated in PNOF mice compared to NF mice. LPC, lysophosphatidylcholine; PC, phosphatidylcholine; CE, cholesteryl ester; TG, triglycerides.

Figure 1

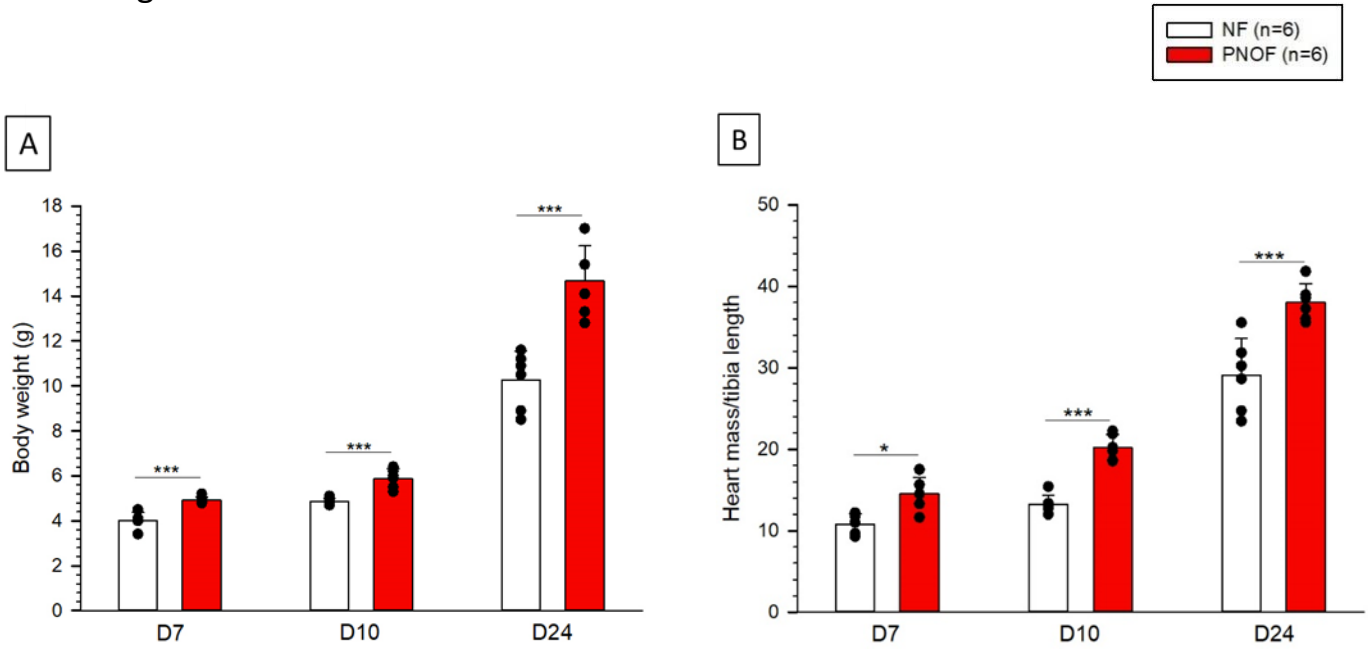


Figure 2

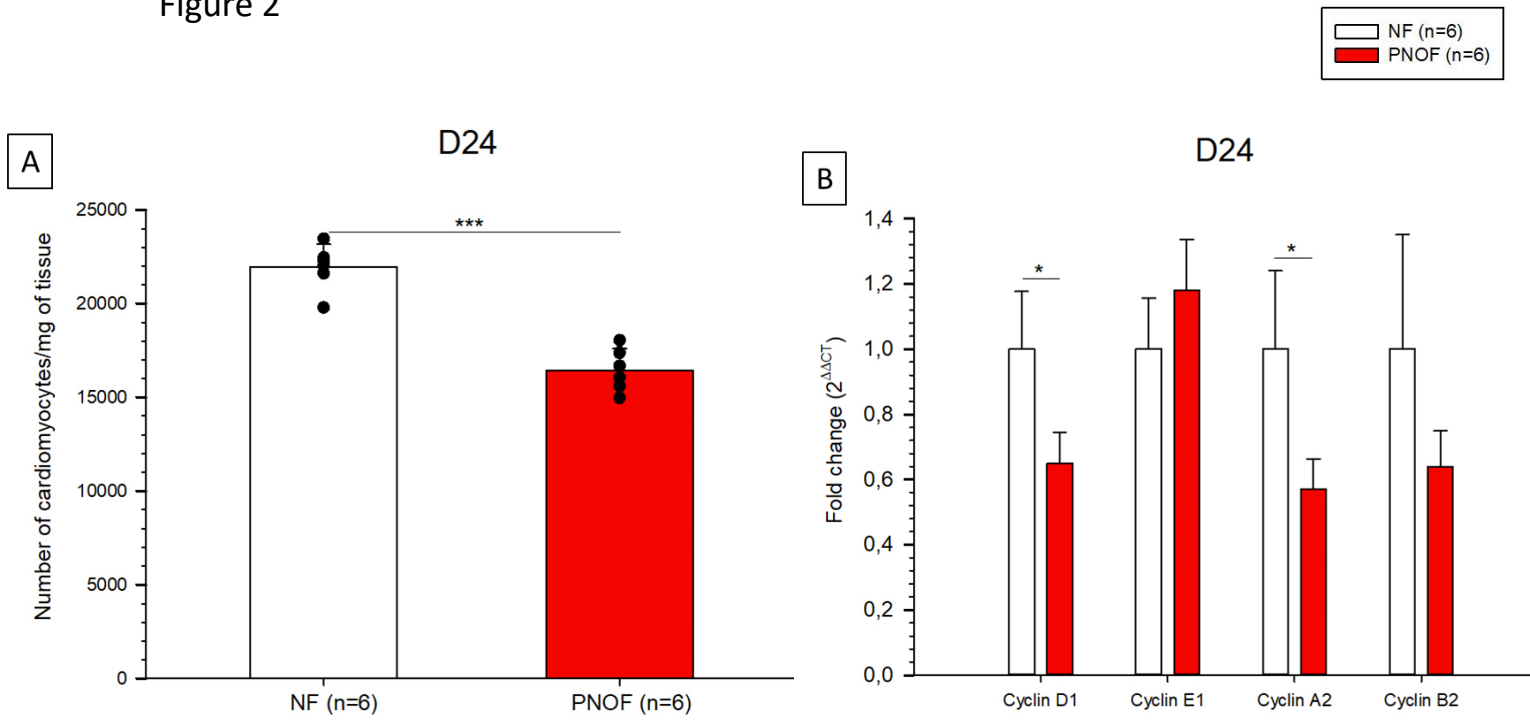


Figure 3

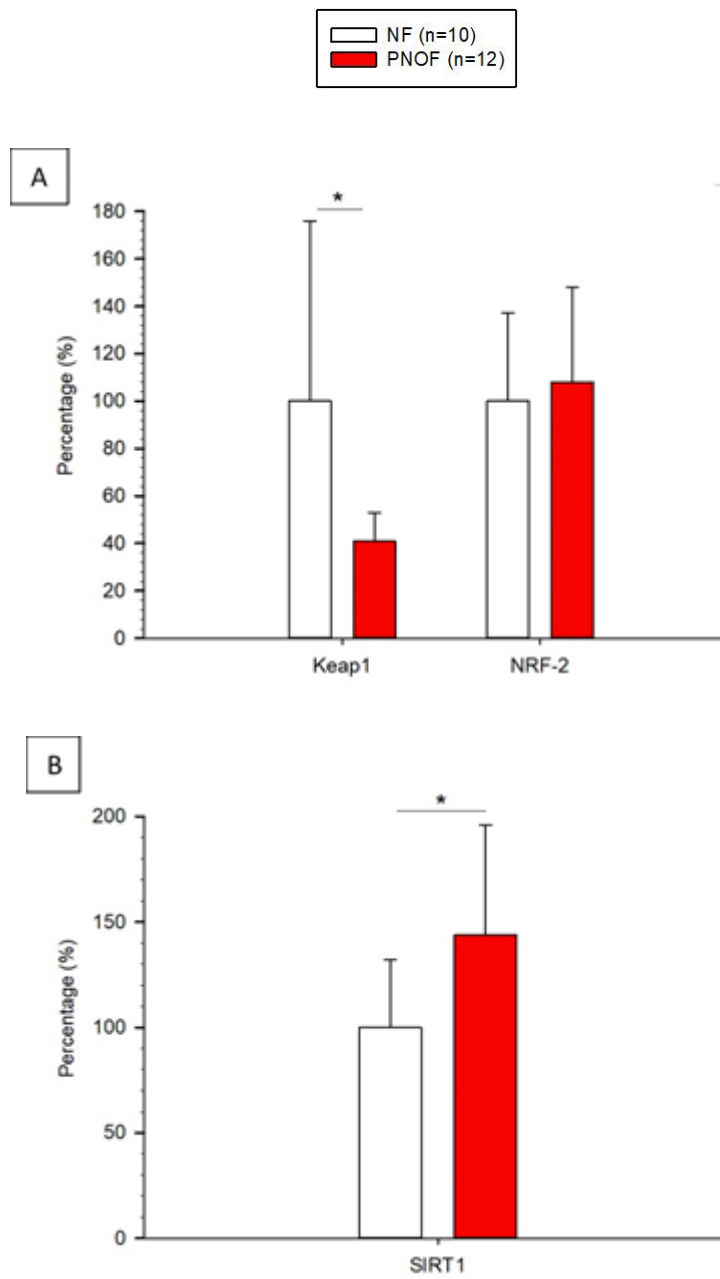
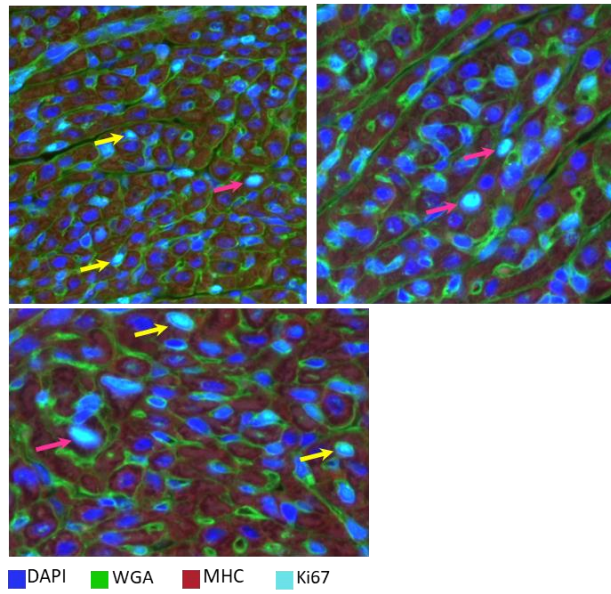
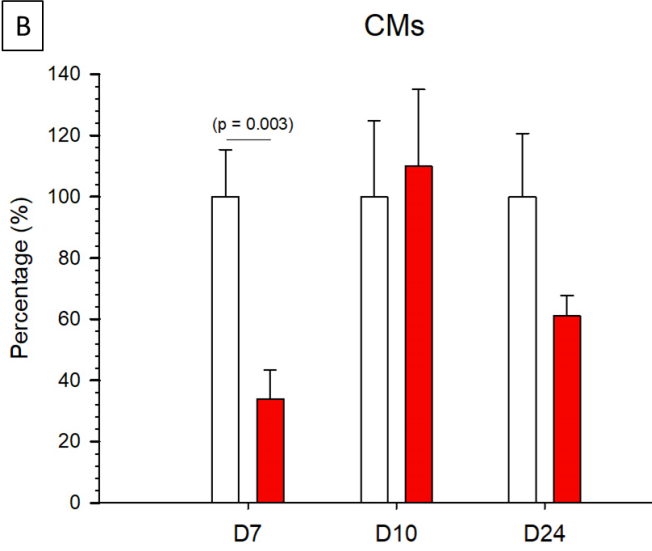


Figure 4

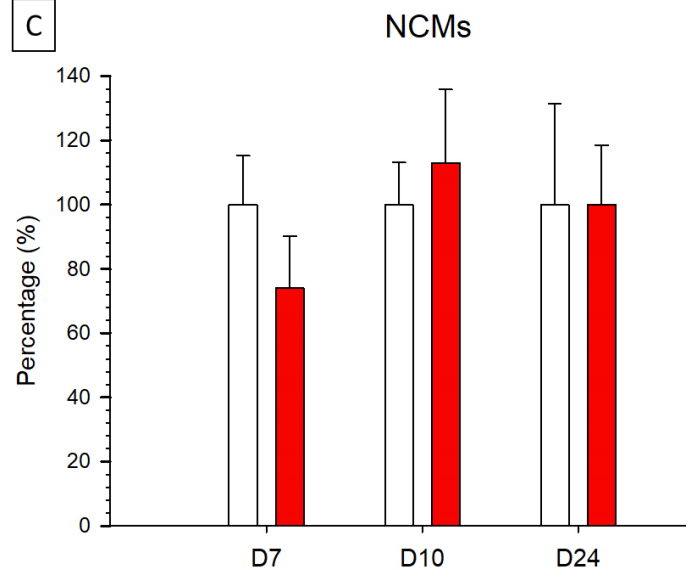
A



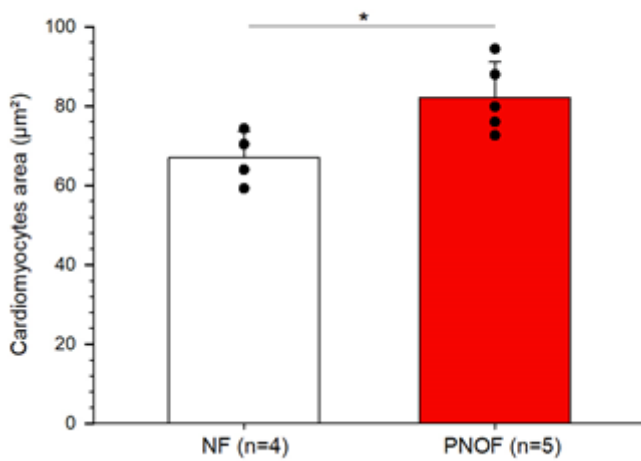
B



C



D



E

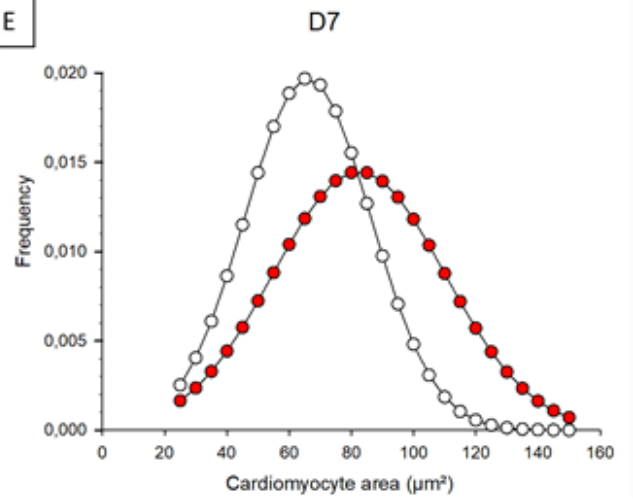
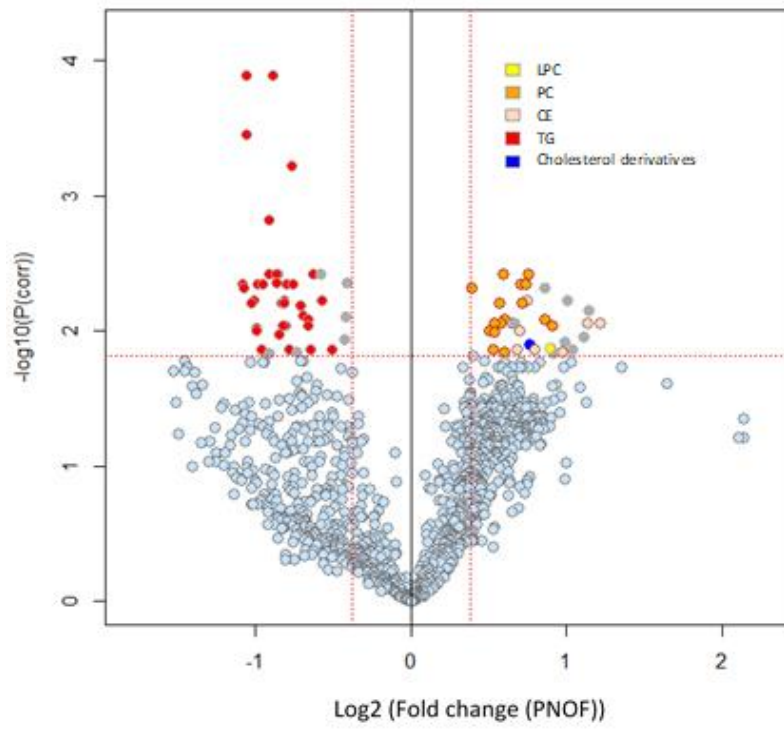


Figure 5



References

1. Ng, M., et al., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2014. **384**(9945): p. 766-81.
2. Garrido-Miguel, M., et al., *Prevalence of Overweight and Obesity among European Preschool Children: A Systematic Review and Meta-Regression by Food Group Consumption*. Nutrients, 2019. **11**(7).
3. Lister, N.B., et al., *Child and adolescent obesity*. Nat Rev Dis Primers, 2023. **9**(1): p. 24.
4. Plagemann, A., et al., *Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012. **26**(5): p. 641-53.
5. Godfrey, K.M., et al., *Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017. **5**(1): p. 53-64.
6. Larque, E., et al., *From conception to infancy - early risk factors for childhood obesity*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(8): p. 456-478.
7. van de Bor, M., *Fetal toxicology*. Handb Clin Neurol, 2019. **162**: p. 31-55.
8. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences*. J Nutr, 2013. **143**(5): p. 553-62.
9. Souza, L.L., E.G. Moura, and P.C. Lisboa, *Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring*. Nutrients, 2022. **14**(10).
10. Bei, F., et al., *Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats*. Lipids Health Dis, 2015. **14**: p. 96.
11. Vieira, A.K., et al., *Overnourishment during lactation induces metabolic and haemodynamic heart impairment during adulthood*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2015. **25**(11): p. 1062-9.
12. Ramon-Krauel, M., et al., *Epigenetic programming at the Mogat1 locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance*. FASEB J, 2018: p. fj201700717RR.
13. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood*. Biochimie, 2012. **94**(1): p. 117-24.
14. Josse, M., et al., *Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
15. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56981.
16. Li, N., et al., *Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 30817.
17. Wang, H., et al., *Natural Heart Regeneration in a Neonatal Rat Myocardial Infarction Model*. Cells, 2020. **9**(1).
18. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1078-80.
19. Haubner, B.J., et al., *Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(12): p. 966-77.
20. Mahmoud, A.I., et al., *Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 249-253.
21. Leu, M., E. Ehler, and J.C. Perriard, *Characterisation of postnatal growth of the murine heart*. Anat Embryol (Berl), 2001. **204**(3): p. 217-24.
22. Padula, S.L., N. Velayutham, and K.E. Yutzey, *Transcriptional Regulation of Postnatal Cardiomyocyte Maturation and Regeneration*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(6).

23. Lopaschuk, G.D. and J.S. Jaswal, *Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **56**(2): p. 130-40.
24. Piquereau, J. and R. Ventura-Clapier, *Maturation of Cardiac Energy Metabolism During Perinatal Development*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 959.
25. Neary, M.T., et al., *Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **74**(100): p. 340-52.
26. Bon-Mathier, A.C., et al., *Oxygen as a key regulator of cardiomyocyte proliferation: New results about cell culture conditions!* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020. **1867**(3): p. 118460.
27. Nakano, H., et al., *Glucose inhibits cardiac muscle maturation through nucleotide biosynthesis*. Elife, 2017. **6**.
28. Honkoop, H., et al., *Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by ErbB2 signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart*. Elife, 2019. **8**.
29. Mills, R.J., et al., *Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(40): p. E8372-E8381.
30. Cardoso, A.C., et al., *Mitochondrial Substrate Utilization Regulates Cardiomyocyte Cell Cycle Progression*. Nat Metab, 2020. **2**(2): p. 167-178.
31. Paredes, A., et al., *gamma-Linolenic acid in maternal milk drives cardiac metabolic maturation*. Nature, 2023. **618**(7964): p. 365-373.
32. Rosenblatt-Velin, N., et al., *FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1724-33.
33. Bon-Mathier, A.C., et al., *Brain Natriuretic Peptide Protects Cardiomyocytes from Apoptosis and Stimulates Their Cell Cycle Re-Entry in Mouse Infarcted Hearts*. Cells, 2022. **12**(1).
34. Ruiz, M., et al., *Lipidomics unveils lipid dyshomeostasis and low circulating plasmalogens as biomarkers in a monogenic mitochondrial disorder*. JCI Insight, 2019. **4**(14).
35. de Moura Freitas, C., et al., *Mitochondrial impairment following neonatal overfeeding: A comparison between normal and ischemic-reperfused hearts*. J Cell Biochem, 2019. **120**(5): p. 7341-7352.
36. Moreira, A.S., et al., *Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009. **19**(11): p. 805-10.
37. Bernardo, A.F., et al., *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, 2016. **29**: p. 124-32.
38. Li, F., et al., *Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(8): p. 1737-46.
39. Cao, T., et al., *Fatty Acid Oxidation Promotes Cardiomyocyte Proliferation Rate but Does Not Change Cardiomyocyte Number in Infant Mice*. Front Cell Dev Biol, 2019. **7**: p. 42.
40. Gonzalez-Hedstrom, D., et al., *Overfeeding During Lactation in Rats is Associated with Cardiovascular Insulin Resistance in the Short-Term*. Nutrients, 2020. **12**(2).
41. Xavier, J.L.P., et al., *Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring*. An Acad Bras Cienc, 2019. **91**(1): p. e20170971.
42. Nakamura, M.T., B.E. Yudell, and J.J. Loor, *Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids*. Prog Lipid Res, 2014. **53**: p. 124-44.
43. Tan, J., et al., *The role of short-chain fatty acids in health and disease*. Adv Immunol, 2014. **121**: p. 91-119.
44. Puente, B.N., et al., *The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response*. Cell, 2014. **157**(3): p. 565-79.
45. Bellezza, I., et al., *Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018. **1865**(5): p. 721-733.

-
46. Singh, C.K., et al., *The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2018. **28**(8): p. 643-661.
 47. Matsushima, S. and J. Sadoshima, *The role of sirtuins in cardiac disease*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **309**(9): p. H1375-89.
 48. Cunha, A.C., et al., *Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2*. *J Nutr Biochem*, 2009. **20**(6): p. 435-42.
 49. Sefcikova, Z., et al., *Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests*. *Physiol Res*, 2011. **60**(2): p. 337-46.
 50. Payan, S.M., F. Hubert, and F. Rochais, *Cardiomyocyte proliferation, a target for cardiac regeneration*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020. **1867**(3): p. 118461.
 51. Secco, I. and M. Giacca, *Regulation of endogenous cardiomyocyte proliferation: The known unknowns*. *J Mol Cell Cardiol*, 2023. **179**: p. 80-89.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les objectifs de ce travail de Thèse ont été de mettre en évidence l'impact de la suralimentation postnatale chez la souris, dans deux contextes d'étude différents.

Dans un premier temps, nous avons voulu explorer les conséquences à long terme de la SA, en situation de pathologie cardiovasculaire chez la souris adulte, et plus particulièrement les conséquences durables d'un infarctus du myocarde sur la fonction cardiaque et le développement d'une insuffisance cardiaque. En effet, il avait été précédemment montré dans le laboratoire que les souris SA présentaient une sensibilité cardiaque augmentée aux lésions d'ischémie-reperfusion *ex vivo*, avec notamment une augmentation de la taille d'infarctus ainsi qu'une diminution de la récupération fonctionnelle des paramètres de la fonction cardiaque, tels que le flux coronaire ou encore la pression développée par le ventricule gauche [60, 69, 80]. Dans la continuité de ces résultats, nous nous attendions à observer des signes d'insuffisance cardiaque post-IDM plus sévères et plus précoces chez les souris SA que chez les souris NA. Initialement, nous avons observé une faible réduction de la fraction d'éjection et une légère augmentation de l'aire et du volume téléstolique du ventricule gauche chez les souris SA, démontrant une fonction cardiaque légèrement altérée avant même la chirurgie. Après avoir été soumises à un IDM expérimental, les souris NA et SA ont développé une insuffisance cardiaque. Cela s'est traduit par une détérioration rapide et importante de la fonction contractile objectivée par la diminution de près de 50% de la fraction d'éjection ventriculaire gauche dans les deux groupes de souris, ainsi que d'une importante dilatation ventriculaire et d'une hypertrophie cardiaque. Néanmoins, malgré cette importante réduction de la fonction contractile, des mécanismes compensateurs ont, dans un premier temps, permis le maintien d'un débit cardiaque adéquat et donc de stabiliser la pathologie dans un état d'insuffisance cardiaque compensée [242]. Au cours du temps, tandis que les souris NA n'ont pas montré de changements du volume d'éjection systolique (VES), de la fréquence cardiaque (FC) ou encore du débit cardiaque (DC) jusqu'à 6 mois post-IDM, les souris SA ont rapidement présenté une diminution du VES accompagnée d'une élévation de la FC. Malgré le maintien initial du DC les premiers mois post-IDM, une baisse significative ainsi qu'une tendance à la diminution ont été observées 4 et 6 mois post-IDM, respectivement. La présence de fibrose cardiaque interstitielle importante et l'hypertrophie ventriculaire participent au remodelage cardiaque délétère et sont associées à un risque cardiovasculaire plus important chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque [243, 244]. Comme évoqué

dans la discussion de l'article, malgré la présence d'hypertrophie et de fibrose cardiaque fréquemment rapportée chez les animaux SA [69, 79, 86, 90, 110], nous n'avons pas observé de différence de la masse ventriculaire gauche ou de fibrose interstitielle dans la zone éloignée de l'infarctus entre les souris NA et SA. Bien que le ventricule gauche connaisse un important remaniement au cours du remodelage post-IDM, nous nous attendions à voir la présence plus importante du marquage et de l'expression du collagène, une élévation de la masse ventriculaire ou encore de l'expression du marqueur hypertrophique β -MHC dans les cœurs de souris SA. L'altération plus précoce du VES, et par la suite du DC, chez les souris SA passerait donc par des processus différents de ceux analysés dans cette étude. Les mécanismes compensateurs impliqués dans l'évolution de la pathologie pourraient être mis en causes. Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est un facteur important dans l'adaptation de l'organisme aux différents changements hémodynamiques post-IDM, notamment au niveau rénal avec l'augmentation de la réabsorption d'eau et de sodium grâce à la libération d'angiotensine II et d'aldostérone [221]. Un certain nombre d'études ayant exploré l'impact d'une SA sur la fonction rénale ont mis en évidence le développement de dysfonctions rénales, fonctionnelles et structurelles, chez des rongeurs SA [91, 99]. Des altérations au niveau de la sensibilité et de l'expression des composants du SRAA ont également été rapportées dans le rein [94, 104] mais également dans le cœur [70], suggérant que la réponse à l'angiotensine II (Ag II) ou à la rénine pourrait être inadaptée chez les animaux SA. L'activation du système nerveux sympathique (SNS), tout d'abord initiée par les barorécepteurs cardiaques, joue également un rôle important dans le maintien du DC post-IDM, notamment grâce à son effet inotrope et chronotrope positif sur le myocarde ou encore en augmentant la pression artérielle par vasoconstriction des vaisseaux périphériques [221]. Cependant, une vasoconstriction vasculaire trop importante entraîne également une augmentation de la postcharge contre laquelle doit lutter le myocarde, contribuant à la dégradation progressive de la fonction ventriculaire au cours de l'insuffisance cardiaque [245]. La présence d'une augmentation de la pression artérielle chez les animaux SA a été largement décrite dans les études portant sur les conséquences de la SA [83, 86, 91-93]. Dans notre étude, il est donc possible que la présence d'une hypertension artérielle préexistante et aggravée par la suractivation du SNS chez les souris SA soit impliquée dans la diminution du VES post-IDM, malgré l'augmentation de la FC. Les deux protocoles suivis dans cette étude ont également permis de souligner une diminution d'expression de la troponine cardiaque T dans les cœurs

de souris SA. A 2 mois post-chirurgie, les souris soumises à un IDM présentaient déjà une baisse de cette expression par rapport aux souris SA soumises à une chirurgie sham, de façon significative dans la zone infarctée et avec une tendance dans la zone éloignée de l'infarctus. Cette tendance à la baisse est également retrouvée à 6 mois post-IDM chez les souris SA par rapport aux souris NA dans la zone éloignée de l'infarctus. Une telle baisse d'expression de la troponine cardiaque pourrait souligner la présence d'une mort des cardiomyocytes plus importante chez les souris SA. Dans cette étude, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence la présence d'apoptose dans la zone éloignée de l'infarctus, par le marquage immunofluorescent de la caspase 3, afin d'étayer cette hypothèse. Cependant, la mort des cardiomyocytes par apoptose ne représente qu'une seule des 6 voies principales de mort cellulaire dans le myocarde, c'est pourquoi une autre technique d'analyse telle que la technique TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labelling) aurait pu permettre de mettre en évidence la présence d'ADN fragmenté [246]. Une augmentation de la mort des cardiomyocytes survivants dans le cœur des souris SA pourrait ainsi être à l'origine d'une diminution de la contractilité myocardique impactant par la suite le VES. Une étude avait précédemment mis en évidence que les cœurs de rats SA adultes présentent une contractilité diminuée sur un système de perfusion Langendorff associée à une expression de la caspase 8 augmentée [70]. Enfin, il est finalement possible que chacune de ces hypothèses joue un rôle propre dans l'aggravation de la fonction cardiaque des souris SA plusieurs mois après l'IDM et dans la progression de ces souris vers une insuffisance cardiaque décompensée.

Dans un second temps, nous avons étudié les effets précoces de la SA, quelques jours seulement après avoir réduit la taille des portées, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'installation des perturbations métaboliques et cardiovasculaires observées à l'âge adulte. Nous avons ainsi observé que le poids corporel et la masse cardiaque des nouveau-nés SA étaient tous deux augmentés très précocement, dès l'âge de 7 jours, par rapport à leurs congénères NA du même âge. De nombreuses études ont rapporté la mise en place rapide du surpoids chez les rongeurs SA [58, 74, 84] traduisant une hausse de leurs apports caloriques et de leur consommation en lait maternel [57]. L'immunomarquage du marqueur de prolifération Ki67+ a révélé une baisse de la prolifération des cardiomyocytes dans les cœurs de nouveau-nés SA, 7 jours après la naissance, sans impacter la prolifération des autres types cellulaires, et engendrant une réduction de 25% du nombre de

cardiomyocytes dans les cœurs de souris SA au sevrage. Après la naissance, les cardiomyocytes dans le cœur conservent une capacité proliférative et sortent du cycle cellulaire au cours des 7 premiers jours de vie [146]. La réduction de la fenêtre proliférative observée à 7 jours était associée à une augmentation de la taille des cardiomyocytes, traduisant leur maturation par croissance hypertrophique plus précoce. Des études ont montré que la prolifération et la maturation myocardique postnatales pouvaient être influencées par des changements de substrats métaboliques préférentiellement utilisés par le cœur [161, 162, 164]. En effet, le métabolisme cardiaque repose essentiellement sur la balance d'utilisation du glucose et des acides gras par les mitochondries. La naissance marque la transition d'un métabolisme reposant principalement sur le glucose vers l'utilisation des acides gras comme source d'énergie principale [168]. Une inhibition de la consommation de ces acides gras [164] ou une augmentation de celle du glucose [161] au cours de la période postnatale immédiate permettrait de prolonger la fenêtre proliférative des cardiomyocytes. Des données ont montré d'une part que le lait maternel des mères de portées de taille réduite était enrichi en lipides et en triglycérides [57, 58] et d'autre part que les taux plasmatiques de triglycérides et de cholestérol étaient augmentés chez de jeunes rats SA dès 10 jours [84] et 14 jours après la naissance [58]. Nous nous attendions donc à observer une augmentation du taux de triglycérides dans le plasma de nouveau-nés âgés de 10 jours. A l'inverse, de façon surprenante, l'analyse lipidomique a montré une diminution des taux de triglycérides circulants chez ces nouveau-nés SA. Les raisons d'une telle baisse n'ont pas encore été identifiées mais elle pourrait être causée par un stockage ou une utilisation plus importante des lipides dans certains territoires de l'organisme, aboutissant à une augmentation de leur présence dans les différents tissus adipeux, viscéral, brun ou abdominal [58, 82, 90] voire dans le cœur [90] au sevrage. Il est intéressant de noter qu'une étude lipidomique réalisée chez des rats SA au sevrage a mis en évidence une élévation plasmatique de 10 acides gras à longue chaîne, saturés et insaturés, et dont 4 d'entre eux persistait à l'âge adulte [74]. Il semblerait donc qu'un rapide et conséquent changement du profil lipidique des animaux SA ait lieu entre le début de la SA et le sevrage, 21 jours plus tard. Néanmoins, un nombre de données croissantes mettent en évidence que la qualité des lipides présents dans l'organisme serait tout aussi impactante sur la santé que leur quantité, notamment au cours de la période postnatale immédiate [247, 248]. De plus, la supplémentation de l'alimentation avec de l'huile de poisson enrichie en acides gras polyinsaturés oméga 3 a montré une réduction du poids

corporel et du taux de triglycérides, ainsi qu'une amélioration de la tolérance au glucose, chez des rats SA adultes [249]. C'est donc pourquoi il est essentiel d'identifier plus spécifiquement les acides gras sous-régulés dans le plasma des nouveau-nés SA. Par ailleurs, le métabolisme du glucose présente lui aussi des changements très précoces chez les rongeurs SA. En effet, une élévation du taux de glucose plasmatique est observée chez les animaux SA de façon très précoce, dès 7 jours [58] et 10 jours postnatal [78], ainsi qu'au sevrage [82, 90]. Plusieurs études ont également montré que les cœurs de souris SA présentaient des altérations de la signalisation de l'insuline à 10 et 21 jours, à travers des changements d'expression du récepteur à l'insuline IR, des GLUT4 et GLUT1, ce qui suggère une utilisation préférentielle du glucose par le cœur [78, 90]. Cependant, le manque de données concernant l'utilisation des substrats métaboliques par les mitochondries dans les cœurs de souris de 7 jours ne permet pas de conclure avec certitude pour le moment.

Ainsi, à l'âge adulte, les souris SA présentent un surpoids associé à une hypertrophie cardiaque ainsi qu'à une dilatation modérée de la cavité ventriculaire, comme il l'a été mis en évidence dans notre étude. De tels changements de la structure du myocarde sont souvent observés chez des individus obèses [250]. Néanmoins, la fonction contractile du myocarde, notamment la fraction d'éjection du VG, n'est pas impactée chez les individus obèses et n'est pas corrélée à l'IMC [251]. Avant le début du protocole d'IDM, les souris SA présentaient une fraction d'éjection ventriculaire modérément réduite par rapport aux souris NA. Il se pourrait que la réduction du nombre de cardiomyocytes mise en évidence dans les cœurs de jeunes souris SA et induite par la baisse de prolifération postnatale joue un rôle important dans cette altération cardiaque légère, en « programmant » le nombre de cardiomyocytes. De plus, après l'IDM, bien que la fraction d'éjection n'ait pas montré de différence ou d'altération plus prononcée chez les souris SA, une baisse d'expression de la troponine T cardiaque a été observée. La mort des cellulaires cardiaques contractiles après un infarctus du myocarde est suivie d'un très faible taux de prolifération qui ne permet pas de régénérer le myocarde [252]. C'est pourquoi une réduction du nombre initial de cardiomyocytes présents dans le cœur représenterait un désavantage considérable face à la survenue d'une pathologie cardiovasculaire.

Au niveau métabolique, bien que des analyses complémentaires soient nécessaires pour comprendre les mécanismes mis en jeu, des changements de substrats circulants très précoces semblent avoir lieu seulement quelques jours seulement après le début de la SA. Par

ailleurs, il est important de souligner que l'insuffisance cardiaque est accompagnée de profondes modifications métaboliques, puisqu'une diminution de l'oxydation des acides gras est observée au profit d'une plus grande utilisation du glucose [253]. Il est donc tout à fait possible que les changements métaboliques observés dès le plus jeune âge chez les animaux SA aient un impact de longue durée sur le métabolisme cardiaque à travers le développement d'une intolérance au glucose précoce ou encore par l'accumulation de lipides dans les cellules cardiaques.

Limites de l'étude

Malgré un grand nombre de résultats obtenus dans l'étude du développement de l'insuffisance cardiaque post-IDM chez des souris NA et SA, un approfondissement plus important des voies de signalisation, induites par le SRAA et le SNS par exemple, aurait été intéressant pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'aggravation de la fonction cardiaque des souris SA. De plus, la taille d'échantillon pour l'analyse PCR réalisée 6 mois post-IDM notamment, pourrait être trop petite pour conclure avec certitude sur certains résultats et pourrait également empêcher la mise en évidence de différences significatives.

Le marqueur de prolifération Ki67 est très utilisé dans l'étude de la prolifération cellulaire ; cependant, il est également exprimé tout au long de la division cellulaire et ne permet pas de discriminer entre l'endomitose et la division cellulaire. Pour cela, il aurait fallu compléter l'analyse avec un autre marqueur de cytokinèse comme la kinase Aurora B par exemple [254].

Enfin, une grande partie des résultats confrontés dans cette discussion sont aussi bien obtenus chez la souris que chez le rat. Malgré les grandes similitudes entre ces deux espèces, elles présentent tout de même certaines différences physiologiques, notamment vasculaires [255], c'est pourquoi une certaine mesure doit être apportée aux conclusions pouvant être faites.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les deux études réalisées tout au long de ce projet de Thèse permettent d'apporter des connaissances nouvelles quant aux conséquences de la suralimentation postnatale, à court et à long-terme. L'analyse du développement d'une insuffisance cardiaque post-IDM a permis de mettre en évidence des altérations plus précoces de la fonction cardiaque chez les souris SA, au travers notamment d'une expression de la troponine cardiaque diminuée, en étudiant les différents niveaux d'organisation structurale et fonctionnelle cardiaques. Les premiers résultats obtenus dans l'exploration des effets précoces de la SA montrent que des changements métaboliques et cardiaques sont visibles après seulement quelques jours de vie chez les animaux élevés dans une portée de taille réduite. Ces observations permettent d'élaborer des pistes explicatives vis-à-vis des altérations cardio-métaboliques observées chez les animaux SA adultes et pourraient aider à comprendre les mécanismes mis en jeu très tôt durant l'enfance qui contribueraient à la programmation d'une sensibilité accrue aux pathologies cardiovasculaires.

Afin de compléter les résultats obtenus sur l'impact précoce de la SA, une analyse lipidomique ciblée va être réalisée afin d'étudier la composition lipidique plasmatique et cardiaque des nouveau-nés NA et SA, ainsi que celle du lait des mères allaitant des portées de taille normale ou réduite. Des changements de substrats métaboliques circulants devraient être accompagnés de variations d'expression de certains transporteurs clés comme GLUT1, GLUT4 ou CD36 dans les cellules cardiaques, c'est pourquoi une analyse de leur expression génétique dans des cardiomyocytes néonataux isolés va être envisagée. Enfin, il se pourrait que les modifications métaboliques observées ne soient pas la seule cause de la baisse de prolifération des cardiomyocytes, comme cela a pu être observé avec la diminution de l'expression de certaines cyclines dans les cœurs de souris SA au sevrage. Il serait donc pertinent d'étudier l'expression d'un certain nombre de facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, comme celle de CDKs, de cyclines ou encore des régulateurs YAP et TAZ de la voie Hippo, au sein des cardiomyocytes.

Enfin, chez l'humain, le concept de programmation s'étend sur les deux premières années de vie et est aujourd'hui connu sous le terme des « 1000 premiers jours ». Cette période ne s'arrête donc pas à la période de lactation, ce qui rend son étude d'autant plus difficile. Des études sur la composition du lait maternel de mères obèses ou en surpoids ont été réalisées, et ont montré des modifications de leur profil lipidique. Dans un premier temps, il pourrait

être intéressant de comparer les différents profils lipidiques des mères-souris allaitant des portées de taille réduite à celles de mères-souris en surpoids ou obèses. L'extrapolation de la souris à l'humain doit être tempérée par le fait que les tailles des portées ne sont pas comparables, et qu'une femme n'allaite en général qu'un seul nourrisson, au maximum deux ou trois dans le cadre de gémellités. Si l'allaitement par des mères en surpoids ou obèses a montré une corrélation positive avec une augmentation du risque d'obésité infantile, une étude épidémiologique pourrait être conduite afin de déterminer si les enfants allaités par une mère obèse ou saine présentent des différences métaboliques et cardiaques à un jeune âge et plus tard à l'âge adulte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Williams, E.P., et al., *Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem*. *Curr Obes Rep*, 2015. **4**(3): p. 363-70.
2. Ng, M., et al., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. *Lancet*, 2014. **384**(9945): p. 766-81.
3. Janssen, F., A. Bardoutsos, and N. Vidra, *Obesity Prevalence in the Long-Term Future in 18 European Countries and in the USA*. *Obes Facts*, 2020. **13**(5): p. 514-527.
4. Fontbonne, A., et al., *Prevalence of Overweight and Obesity in France: The 2020 Obepi-Roche Study by the "Ligue Contre l'Obesite"*. *J Clin Med*, 2023. **12**(3).
5. Pigeyre, M., et al., *Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity*. *Clin Sci (Lond)*, 2016. **130**(12): p. 943-86.
6. Duis, J. and M.G. Butler, *Syndromic and Nonsyndromic Obesity: Underlying Genetic Causes in Humans*. *Adv Biol (Weinh)*, 2022. **6**(10): p. e2101154.
7. Baron, M., P. Froguel, and A. Bonnefond, *[Something new in the genetics of monogenic obesity and its insights into pathophysiology]*. *Med Sci (Paris)*, 2020. **36**(10): p. 859-865.
8. Apovian, C.M., *Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden*. *Am J Manag Care*, 2016. **22**(7 Suppl): p. s176-85.
9. Nicolaidis, S., *Environment and obesity*. *Metabolism*, 2019. **100S**: p. 153942.
10. Cristian, A., J.L. Tarry-Adkins, and C.E. Aiken, *The Uterine Environment and Childhood Obesity Risk: Mechanisms and Predictions*. *Curr Nutr Rep*, 2023. **12**(3): p. 416-425.
11. Ibrahim, M.M., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences*. *Obes Rev*, 2010. **11**(1): p. 11-8.
12. Scheja, L. and J. Heeren, *The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease*. *Nat Rev Endocrinol*, 2019. **15**(9): p. 507-524.
13. Fasshauer, M. and M. Bluher, *Adipokines in health and disease*. *Trends Pharmacol Sci*, 2015. **36**(7): p. 461-70.
14. Kawai, T., M.V. Autieri, and R. Scalia, *Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021. **320**(3): p. C375-C391.
15. Ahmed, B., R. Sultana, and M.W. Greene, *Adipose tissue and insulin resistance in obese*. *Biomed Pharmacother*, 2021. **137**: p. 111315.
16. Avgerinos, K.I., et al., *Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives*. *Metabolism*, 2019. **92**: p. 121-135.
17. Piche, M.E., A. Tchernof, and J.P. Despres, *Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases*. *Circ Res*, 2020. **126**(11): p. 1477-1500.
18. Jehan, S., et al., *Obstructive Sleep Apnea and Obesity: Implications for Public Health*. *Sleep Med Disord*, 2017. **1**(4).
19. Samson, S.L. and A.J. Garber, *Metabolic syndrome*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2014. **43**(1): p. 1-23.
20. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. *Circulation*, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
21. Izquierdo, A.G., et al., *Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later?* *Nutrients*, 2019. **11**(11).
22. Ghadge, A.A. and A.A. Khaire, *Leptin as a predictive marker for metabolic syndrome*. *Cytokine*, 2019. **121**: p. 154735.
23. Klop, B., J.W. Elte, and M.C. Cabezas, *Dyslipidemia in obesity: mechanisms and potential targets*. *Nutrients*, 2013. **5**(4): p. 1218-40.
24. Jung, E., et al., *Serum Cholesterol Levels and Risk of Cardiovascular Death: A Systematic Review and a Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies*. *Int J Environ Res Public Health*, 2022. **19**(14).

25. Seravalle, G. and G. Grassi, *Obesity and hypertension*. Pharmacol Res, 2017. **122**: p. 1-7.
26. Kotsis, V., et al., *Mechanisms of obesity-induced hypertension*. Hypertens Res, 2010. **33**(5): p. 386-93.
27. Csige, I., et al., *The Impact of Obesity on the Cardiovascular System*. J Diabetes Res, 2018. **2018**: p. 3407306.
28. Alpert, M.A., et al., *Obesity and Cardiac Remodeling in Adults: Mechanisms and Clinical Implications*. Prog Cardiovasc Dis, 2018. **61**(2): p. 114-123.
29. Aurigemma, G.P., G. de Simone, and T.P. Fitzgibbons, *Cardiac remodeling in obesity*. Circ Cardiovasc Imaging, 2013. **6**(1): p. 142-52.
30. Russo, C., et al., *Effect of obesity and overweight on left ventricular diastolic function: a community-based study in an elderly cohort*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(12): p. 1368-74.
31. Kenchaiah, S., et al., *Obesity and the risk of heart failure*. N Engl J Med, 2002. **347**(5): p. 305-13.
32. Lavie, C.J., et al., *Impact of obesity and the obesity paradox on prevalence and prognosis in heart failure*. JACC Heart Fail, 2013. **1**(2): p. 93-102.
33. Zeller, M., et al., *Relation between body mass index, waist circumference, and death after acute myocardial infarction*. Circulation, 2008. **118**(5): p. 482-90.
34. Breda, J., et al., *Methodology and implementation of the WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI)*. Obes Rev, 2021. **22 Suppl 6**: p. e13215.
35. Garrido-Miguel, M., et al., *Prevalence of Overweight and Obesity among European Preschool Children: A Systematic Review and Meta-Regression by Food Group Consumption*. Nutrients, 2019. **11**(7).
36. Pulgaron, E.R., *Childhood obesity: a review of increased risk for physical and psychological comorbidities*. Clin Ther, 2013. **35**(1): p. A18-32.
37. Simmonds, M., et al., *Predicting adult obesity from childhood obesity: a systematic review and meta-analysis*. Obes Rev, 2016. **17**(2): p. 95-107.
38. Gluckman, P.D., M.A. Hanson, and T. Buklijas, *A conceptual framework for the developmental origins of health and disease*. J Dev Orig Health Dis, 2010. **1**(1): p. 6-18.
39. Barker, D.J. and C. Osmond, *Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales*. Lancet, 1986. **1**(8489): p. 1077-81.
40. Barker, D.J., et al., *Weight in infancy and death from ischaemic heart disease*. Lancet, 1989. **2**(8663): p. 577-80.
41. Barker, D.J., et al., *Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life*. BMJ, 1990. **301**(6746): p. 259-62.
42. Hales, C.N. and D.J. Barker, *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*. Diabetologia, 1992. **35**(7): p. 595-601.
43. Barker, D.J., et al., *Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life*. Lancet, 1993. **341**(8850): p. 938-41.
44. Mohseni, R., et al., *Birth Weight and Risk of Cardiovascular Disease Incidence in Adulthood: a Dose-Response Meta-analysis*. Curr Atheroscler Rep, 2020. **22**(3): p. 12.
45. Godfrey, K.M., et al., *Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017. **5**(1): p. 53-64.
46. Williams, L., et al., *Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(3): p. 507-519.
47. Gniuli, D., et al., *Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny*. J Lipid Res, 2008. **49**(9): p. 1936-45.
48. Buckley, A.J., et al., *Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats*. Metabolism, 2005. **54**(4): p. 500-7.
49. McCrory, C. and R. Layte, *Breastfeeding and risk of overweight and obesity at nine-years of age*. Soc Sci Med, 2012. **75**(2): p. 323-30.
50. Ma, J., et al., *Breastfeeding and childhood obesity: A 12-country study*. Matern Child Nutr, 2020. **16**(3): p. e12984.

51. Yan, J., et al., *The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis*. BMC Public Health, 2014. **14**: p. 1267.
52. Rudnicka, A.R., C.G. Owen, and D.P. Strachan, *The effect of breastfeeding on cardiorespiratory risk factors in adult life*. Pediatrics, 2007. **119**(5): p. e1107-15.
53. Qiao, J., et al., *A Meta-Analysis of the Association Between Breastfeeding and Early Childhood Obesity*. J Pediatr Nurs, 2020. **53**: p. 57-66.
54. Labayen, I., et al., *Exclusive breastfeeding duration and cardiorespiratory fitness in children and adolescents*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(2): p. 498-505.
55. Martin, C.R., P.R. Ling, and G.L. Blackburn, *Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula*. Nutrients, 2016. **8**(5).
56. Pomar, C.A., et al., *Maternal Overfeeding during Lactation Impairs the Metabolic Response to Fed/Fasting Changing Conditions in the Postweaning Offspring*. Mol Nutr Food Res, 2019. **63**(20): p. e1900504.
57. Cunha, A.C., et al., *Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(6): p. 435-42.
58. Xavier, J.L.P., et al., *Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring*. An Acad Bras Cienc, 2019. **91**(1): p. e20170971.
59. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences*. J Nutr, 2013. **143**(5): p. 553-62.
60. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood*. Biochimie, 2012. **94**(1): p. 117-24.
61. Conceicao, E.P., et al., *Neonatal overfeeding causes higher adrenal catecholamine content and basal secretion and liver dysfunction in adult rats*. Eur J Nutr, 2013. **52**(4): p. 1393-404.
62. Rodrigues, A.L., et al., *Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(2): p. 109-17.
63. Plagemann, A., et al., *Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 20): p. 4963-76.
64. Plagemann, A., et al., *Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats*. Brain Res, 1999. **818**(1): p. 160-3.
65. Plagemann, A., et al., *Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats*. Brain Res, 1999. **836**(1-2): p. 146-55.
66. Harder, T., et al., *Overweight and increased diabetes susceptibility in neonatally insulin-treated adult rats*. Endocr Regul, 1999. **33**(1): p. 25-31.
67. Heidel, E., A. Plagemann, and H. Davidowa, *Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats*. Neuroreport, 1999. **10**(9): p. 1827-31.
68. Balonan, L.C. and H.P. Sheng, *Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats*. Pediatr Res, 2000. **48**(5): p. 668-73.
69. Habbout, A., et al., *Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56981.
70. Granado, M., et al., *Long-term effects of early overnutrition in the heart of male adult rats: role of the renin-angiotensin system*. PLoS One, 2014. **8**(6): p. e65172.
71. Kayser, B.D., M.I. Goran, and S.G. Bouret, *Perinatal overnutrition exacerbates adipose tissue inflammation caused by high-fat feeding in C57BL/6J mice*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121954.
72. Boullu-Ciocca, S., et al., *Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood*. Diabetes, 2008. **57**(3): p. 669-77.

73. Boullu-Ciocca, S., et al., *Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome*. *Diabetes*, 2005. **54**(1): p. 197-203.
74. Bei, F., et al., *Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats*. *Lipids Health Dis*, 2015. **14**: p. 96.
75. Boullu-Ciocca, S., et al., *Pioglitazone in adult rats reverses immediate postnatal overfeeding-induced metabolic, hormonal, and inflammatory alterations*. *Endocrine*, 2015. **50**(3): p. 608-19.
76. Morris, M.J., E. Velkoska, and T.J. Cole, *Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment*. *Exp Physiol*, 2005. **90**(5): p. 697-702.
77. Dias, I., et al., *Neonatal overfeeding impairs differentiation potential of mice subcutaneous adipose mesenchymal stem cells*. *Stem Cell Rev Rep*, 2018. **14**(4): p. 535-545.
78. Pereira, R.O., et al., *Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts*. *Regul Pept*, 2006. **136**(1-3): p. 117-21.
79. Vieira, A.K., et al., *Overnourishment during lactation induces metabolic and haemodynamic heart impairment during adulthood*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2015. **25**(11): p. 1062-9.
80. Li, N., et al., *Short-term moderate diet restriction in adulthood can reverse oxidative, cardiovascular and metabolic alterations induced by postnatal overfeeding in mice*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 30817.
81. de Lade, C.G., et al., *Effects of moderate intensity endurance training vs. high intensity interval training on weight gain, cardiorespiratory capacity, and metabolic profile in postnatal overfed rats*. *Diabetol Metab Syndr*, 2018. **10**: p. 70.
82. Gonzalez-Hedstrom, D., et al., *Overfeeding During Lactation in Rats is Associated with Cardiovascular Insulin Resistance in the Short-Term*. *Nutrients*, 2020. **12**(2).
83. Velkoska, E., T.J. Cole, and M.J. Morris, *Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005. **288**(6): p. E1236-43.
84. Moreira, A.S., et al., *Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009. **19**(11): p. 805-10.
85. de Moura Freitas, C., et al., *Mitochondrial impairment following neonatal overfeeding: A comparison between normal and ischemic-reperfused hearts*. *J Cell Biochem*, 2019. **120**(5): p. 7341-7352.
86. Junior, M.D.F., et al., *Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats*. *Life Sci*, 2019. **226**: p. 173-184.
87. Su, X. and D. Peng, *Emerging functions of adipokines in linking the development of obesity and cardiovascular diseases*. *Mol Biol Rep*, 2020. **47**(10): p. 7991-8006.
88. Smith, C.C. and D.M. Yellon, *Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection*. *Pharmacol Ther*, 2011. **129**(2): p. 206-19.
89. Martins, M.R., et al., *Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice*. *J Endocrinol*, 2008. **198**(3): p. 591-8.
90. Bernardo, A.F., et al., *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*, 2016. **29**: p. 124-32.
91. Yim, H.E., et al., *Overweight, hypertension and renal dysfunction in adulthood of neonatally overfed rats*. *J Nutr Biochem*, 2013. **24**(7): p. 1324-33.
92. Achard, V., et al., *Immediate Postnatal Overfeeding in Rats Programs Aortic Wall Structure Alterations and Metalloproteinases Dysregulation in Adulthood*. *Am J Hypertens*, 2016. **29**(6): p. 719-26.
93. de Araujo, G.A., et al., *Overweight during lactation and its implications for biometric, nutritional and cardiovascular parameters of young and adult male and female rats*. *J Nutr Sci*, 2020. **9**: p. e27.

94. Yim, H.E., et al., *Postnatal early overnutrition dysregulates the intrarenal renin-angiotensin system and extracellular matrix-linked molecules in juvenile male rats*. J Nutr Biochem, 2012. **23**(8): p. 937-45.
95. Rochette, L., et al., *Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?* Pharmacol Ther, 2013. **140**(3): p. 239-57.
96. Manrique, C., G. Lastra, and J.R. Sowers, *New insights into insulin action and resistance in the vasculature*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**(1): p. 138-50.
97. Sanchez-Garcia, G., L. Del Bosque-Plata, and E. Hong, *Postnatal overnutrition affects metabolic and vascular function reflected by physiological and histological changes in the aorta of adult Wistar rats*. Clin Exp Hypertens, 2018. **40**(5): p. 452-460.
98. Boden, G., et al., *In vivo effects of insulin and free fatty acids on matrix metalloproteinases in rat aorta*. Diabetes, 2008. **57**(2): p. 476-83.
99. Boubred, F., et al., *Early postnatal overfeeding induces early chronic renal dysfunction in adult male rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(4): p. F943-51.
100. Alcazar, M.A., et al., *Early postnatal hyperalimentation impairs renal function via SOCS-3 mediated renal postreceptor leptin resistance*. Endocrinology, 2012. **153**(3): p. 1397-410.
101. Pedroza, A., et al., *A maternal low-protein diet and neonatal overnutrition result in similar changes to glomerular morphology and renal cortical oxidative stress measures in male Wistar rats*. Appl Physiol Nutr Metab, 2019. **44**(2): p. 164-171.
102. Juvet, C., et al., *Renal Programming by Transient Postnatal Overfeeding: The Role of Senescence Pathways*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 511.
103. Yim, H.E. and K.H. Yoo, *Early life obesity and chronic kidney disease in later life*. Pediatr Nephrol, 2015. **30**(8): p. 1255-63.
104. Granado, M., et al., *Effects of early overnutrition on the renal response to Ang II and expression of RAAS components in rat renal tissue*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2017. **27**(10): p. 930-937.
105. Sominsky, L., et al., *Neonatal overfeeding increases capacity for catecholamine biosynthesis from the adrenal gland acutely and long-term in the male rat*. Mol Cell Endocrinol, 2018. **470**: p. 295-303.
106. Piquereau, J. and R. Ventura-Clapier, *Maturation of Cardiac Energy Metabolism During Perinatal Development*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 959.
107. Bon-Mathier, A.C., et al., *Oxygen as a key regulator of cardiomyocyte proliferation: New results about cell culture conditions!* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020. **1867**(3): p. 118460.
108. Hortells, L., A.K.Z. Johansen, and K.E. Yutzey, *Cardiac Fibroblasts and the Extracellular Matrix in Regenerative and Nonregenerative Hearts*. J Cardiovasc Dev Dis, 2019. **6**(3).
109. Williams, C., et al., *Young developmental age cardiac extracellular matrix promotes the expansion of neonatal cardiomyocytes in vitro*. Acta Biomater, 2014. **10**(1): p. 194-204.
110. Chavaglia Cavalet, L., et al., *Long-term effects of early overfeeding and food restriction during puberty on cardiac remodeling in adult rats*. J Dev Orig Health Dis, 2020. **11**(5): p. 492-498.
111. Vargas, R. and I.C. Vasquez, *Effects of overfeeding and high-fat diet on cardiosomatic parameters and cardiac structures in young and adult zebrafish*. Fish Physiol Biochem, 2017. **43**(6): p. 1761-1773.
112. Fan, X., et al., *Influence of gestational overfeeding on cardiac morphometry and hypertrophic protein markers in fetal sheep*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(1): p. 30-7.
113. Velkoska, E., et al., *Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1622-7.
114. Ahmed, A. and P. Delgado-Olguin, *Embryonic programming of heart disease in response to obesity during pregnancy*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020. **1866**(2): p. 165402.
115. Marousez, L., J. Lesage, and D. Eberle, *Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming?* Nutrients, 2019. **11**(12).

116. Pauwels, S., et al., *The Influence of the Duration of Breastfeeding on the Infant's Metabolic Epigenome*. *Nutrients*, 2019. **11**(6).
117. Liu, H.W., et al., *Developmental programming in skeletal muscle in response to overnutrition in the immediate postnatal life in rats*. *J Nutr Biochem*, 2013. **24**(11): p. 1859-69.
118. Ramon-Krauel, M., et al., *Epigenetic programming at the Mogat1 locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance*. *FASEB J*, 2018: p. fj201700717RR.
119. Li, G., et al., *Early postnatal overnutrition accelerates aging-associated epigenetic drift in pancreatic islets*. *Environ Epigenet*, 2019. **5**(3): p. dvz015.
120. Blin, G., et al., *Maternal Exposure to High-Fat Diet Induces Long-Term Derepressive Chromatin Marks in the Heart*. *Nutrients*, 2020. **12**(1).
121. Siddeek, B., et al., *Transient postnatal over nutrition induces long-term alterations in cardiac NLRP3-inflammasome pathway*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2018. **28**(9): p. 944-951.
122. Siddeek, B., et al., *Long-term impact of maternal high-fat diet on offspring cardiac health: role of micro-RNA biogenesis*. *Cell Death Discov*, 2019. **5**: p. 71.
123. Vergely, C., et al., *Identification and quantification of free radicals during myocardial ischemia and reperfusion using electron paramagnetic resonance spectroscopy*. *Arch Biochem Biophys*, 2003. **420**(2): p. 209-16.
124. Higuchi, Y., et al., *Involvement of reactive oxygen species-mediated NF-kappa B activation in TNF-alpha-induced cardiomyocyte hypertrophy*. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(2): p. 233-40.
125. Rodriguez-Iturbe, B., H. Pons, and R.J. Johnson, *Role of the Immune System in Hypertension*. *Physiol Rev*, 2017. **97**(3): p. 1127-1164.
126. Wolf, D. and K. Ley, *Immunity and Inflammation in Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2019. **124**(2): p. 315-327.
127. Epelman, S., P.P. Liu, and D.L. Mann, *Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(2): p. 117-29.
128. Meng, X., et al., *Regulatory T cells in cardiovascular diseases*. *Nat Rev Cardiol*, 2016. **13**(3): p. 167-79.
129. Ilatovskaya, D.V., G.V. Halade, and K.Y. DeLeon-Pennell, *Adaptive immunity-driven inflammation and cardiovascular disease*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019. **317**(6): p. H1254-H1257.
130. Turdi, S., et al., *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*, 2013. **55**: p. 117-29.
131. Rochette, L., et al., *Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms*. *Trends Pharmacol Sci*, 2015. **36**(6): p. 326-48.
132. Richard, C., et al., *Oxidative stress and myocardial gene alterations associated with Doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats persist for 2 months after treatment cessation*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **339**(3): p. 807-14.
133. Mitra, M.S., et al., *High fat diet-fed obese rats are highly sensitive to doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2008. **231**(3): p. 413-22.
134. Guenancia, C., et al., *Obesity As a Risk Factor for Anthracyclines and Trastuzumab Cardiotoxicity in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(26): p. 3157-65.
135. Guenancia, C., et al., *Overweight in mice, induced by perinatal programming, exacerbates doxorubicin and trastuzumab cardiotoxicity*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016. **77**(4): p. 777-85.
136. Josse, M., et al., *Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(24).
137. Tan, C.M.J. and A.J. Lewandowski, *The Transitional Heart: From Early Embryonic and Fetal Development to Neonatal Life*. *Fetal Diagn Ther*, 2020. **47**(5): p. 373-386.

138. Buijtendijk, M.F.J., P. Barnett, and M.J.B. van den Hoff, *Development of the human heart*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2020. **184**(1): p. 7-22.
139. Brade, T., et al., *Embryonic heart progenitors and cardiogenesis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(10): p. a013847.
140. Paradis, A.N., M.S. Gay, and L. Zhang, *Binucleation of cardiomyocytes: the transition from a proliferative to a terminally differentiated state*. Drug Discov Today, 2014. **19**(5): p. 602-9.
141. Yuan, X. and T. Braun, *Multimodal Regulation of Cardiac Myocyte Proliferation*. Circ Res, 2017. **121**(3): p. 293-309.
142. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
143. Bergmann, O., et al., *Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart*. Cell, 2015. **161**(7): p. 1566-75.
144. Mollova, M., et al., *Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1446-51.
145. Malliaras, K., et al., *Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(2): p. 191-209.
146. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1078-80.
147. Mahmoud, A.I., et al., *Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest*. Nature, 2013. **497**(7448): p. 249-253.
148. Haubner, B.J., et al., *Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(12): p. 966-77.
149. Burrell, J.H., et al., *Growth and maturation of cardiac myocytes in fetal sheep in the second half of gestation*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2003. **274**(2): p. 952-61.
150. Li, F., et al., *Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(8): p. 1737-46.
151. Shimizu, I. and T. Minamino, *Physiological and pathological cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 245-62.
152. Oldfield, C.J., T.A. Duhamel, and N.S. Dhalla, *Mechanisms for the transition from physiological to pathological cardiac hypertrophy*. Can J Physiol Pharmacol, 2020. **98**(2): p. 74-84.
153. Secco, I. and M. Giacca, *Regulation of endogenous cardiomyocyte proliferation: The known unknowns*. J Mol Cell Cardiol, 2023. **179**: p. 80-89.
154. Ikenishi, A., et al., *Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages*. Dev Growth Differ, 2012. **54**(8): p. 731-8.
155. Tane, S., et al., *CDK inhibitors, p21(Cip1) and p27(Kip1), participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(3): p. 1105-9.
156. Payan, S.M., F. Hubert, and F. Rochais, *Cardiomyocyte proliferation, a target for cardiac regeneration*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020. **1867**(3): p. 118461.
157. von Gise, A., et al., *YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2394-9.
158. Meng, Z., T. Moroishi, and K.L. Guan, *Mechanisms of Hippo pathway regulation*. Genes Dev, 2016. **30**(1): p. 1-17.
159. Puente, B.N., et al., *The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response*. Cell, 2014. **157**(3): p. 565-79.
160. Guimaraes-Camboa, N., et al., *HIF1alpha Represses Cell Stress Pathways to Allow Proliferation of Hypoxic Fetal Cardiomyocytes*. Dev Cell, 2015. **33**(5): p. 507-21.
161. Nakano, H., et al., *Glucose inhibits cardiac muscle maturation through nucleotide biosynthesis*. Elife, 2017. **6**.
162. Honkoop, H., et al., *Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by ErbB2 signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart*. Elife, 2019. **8**.

163. Mills, R.J., et al., *Functional screening in human cardiac organoids reveals a metabolic mechanism for cardiomyocyte cell cycle arrest*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(40): p. E8372-E8381.
164. Cardoso, A.C., et al., *Mitochondrial Substrate Utilization Regulates Cardiomyocyte Cell Cycle Progression*. Nat Metab, 2020. **2**(2): p. 167-178.
165. Lim, G.B., *Inhibiting fatty acid oxidation promotes cardiomyocyte proliferation*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(5): p. 266-267.
166. Zacchigna, S. and M. Giacca, *Extra- and intracellular factors regulating cardiomyocyte proliferation in postnatal life*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(2): p. 312-20.
167. Kolwicz, S.C., Jr., S. Purohit, and R. Tian, *Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes*. Circ Res, 2013. **113**(5): p. 603-16.
168. Lopaschuk, G.D. and J.S. Jaswal, *Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **56**(2): p. 130-40.
169. Pohjoismaki, J.L. and S. Goffart, *The role of mitochondria in cardiac development and protection*. Free Radic Biol Med, 2017. **106**: p. 345-354.
170. Lopaschuk, G.D., et al., *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(1): p. 207-58.
171. Abel, E.D., *Glucose transport in the heart*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 201-15.
172. Foretz, M., et al., *[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]*. Med Sci (Paris), 2006. **22**(4): p. 381-8.
173. Dimasi, C.G., J.R.T. Darby, and J.L. Morrison, *A change of heart: understanding the mechanisms regulating cardiac proliferation and metabolism before and after birth*. J Physiol, 2023. **601**(8): p. 1319-1341.
174. Talman, V., et al., *Molecular Atlas of Postnatal Mouse Heart Development*. J Am Heart Assoc, 2018. **7**(20): p. e010378.
175. Ralapanawa, U. and R. Sivakanesan, *Epidemiology and the Magnitude of Coronary Artery Disease and Acute Coronary Syndrome: A Narrative Review*. J Epidemiol Glob Health, 2021. **11**(2): p. 169-177.
176. Anderson, J.L. and D.A. Morrow, *Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2017. **376**(21): p. 2053-2064.
177. Lu, L., et al., *Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments*. Cell Biochem Biophys, 2015. **72**(3): p. 865-7.
178. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. Circulation, 2018. **138**(20): p. e618-e651.
179. Byrne, R.A., et al., *2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes*. Eur Heart J, 2023. **44**(38): p. 3720-3826.
180. Frobert, A., et al., *Prognostic Value of Troponin I for Infarct Size to Improve Preclinical Myocardial Infarction Small Animal Models*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 353.
181. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
182. Oliveira, J.B., A. Soares, and A.C. Sposito, *Inflammatory Response During Myocardial Infarction*. Adv Clin Chem, 2018. **84**: p. 39-79.
183. Frantz, S., J. Bauersachs, and G. Ertl, *Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 474-81.
184. Venugopal, H., et al., *Properties and Functions of Fibroblasts and Myofibroblasts in Myocardial Infarction*. Cells, 2022. **11**(9).
185. Liu, T., et al., *Current Understanding of the Pathophysiology of Myocardial Fibrosis and Its Quantitative Assessment in Heart Failure*. Front Physiol, 2017. **8**: p. 238.

186. Nagai, T., et al., *Decreased myocardial dendritic cells is associated with impaired reparative fibrosis and development of cardiac rupture after myocardial infarction in humans*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(3): p. e000839.
187. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(4): p. 549-74.
188. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
189. Heineke, J. and J.D. Molkentin, *Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 589-600.
190. Ziaeeian, B. and G.C. Fonarow, *Epidemiology and aetiology of heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2016. **13**(6): p. 368-78.
191. Snipelisky, D., S.P. Chaudhry, and G.C. Stewart, *The Many Faces of Heart Failure*. Card Electrophysiol Clin, 2019. **11**(1): p. 11-20.
192. Tanai, E. and S. Frantz, *Pathophysiology of Heart Failure*. Compr Physiol, 2015. **6**(1): p. 187-214.
193. Gajarsa, J.J. and R.A. Kloner, *Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities*. Heart Fail Rev, 2011. **16**(1): p. 13-21.
194. Vieillard-Baron, A., et al., *A decade of progress in critical care echocardiography: a narrative review*. Intensive Care Med, 2019. **45**(6): p. 770-788.
195. Melillo, E., et al., *Echocardiography in Advanced Heart Failure for Diagnosis, Management, and Prognosis*. Heart Fail Clin, 2021. **17**(4): p. 547-560.
196. Zacchigna, S., et al., *Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function*. Cardiovasc Res, 2021. **117**(1): p. 43-59.
197. Volpe, M., M. Carnovali, and V. Mastromarino, *The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment*. Clin Sci (Lond), 2016. **130**(2): p. 57-77.
198. Weber, M. and C. Hamm, *Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine*. Heart, 2006. **92**(6): p. 843-9.
199. van der Pol, A., et al., *Cardiac foetal reprogramming: a tool to exploit novel treatment targets for the failing heart*. J Intern Med, 2020. **288**(5): p. 491-506.
200. Taegtmeier, H., S. Sen, and D. Vela, *Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1188**: p. 191-8.
201. Razeghi, P., et al., *Metabolic gene expression in fetal and failing human heart*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2923-31.
202. Hong, J.H. and H.G. Zhang, *Transcription Factors Involved in the Development and Prognosis of Cardiac Remodeling*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 828549.
203. Dann, M.M., et al., *Quantification of murine myocardial infarct size using 2-D and 4-D high-frequency ultrasound*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2022. **322**(3): p. H359-H372.
204. Ruiz, M., et al., *Lipidomics unveils lipid dyshomeostasis and low circulating plasmalogens as biomarkers in a monogenic mitochondrial disorder*. JCI Insight, 2019. **4**(14).
205. Hubert, F., et al., *FGF10 promotes cardiac repair through a dual cellular mechanism increasing cardiomyocyte renewal and inhibiting fibrosis*. Cardiovasc Res, 2022. **118**(12): p. 2625-2637.
206. Rosenblatt-Velin, N., et al., *FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1724-33.
207. Bon-Mathier, A.C., et al., *Brain Natriuretic Peptide Protects Cardiomyocytes from Apoptosis and Stimulates Their Cell Cycle Re-Entry in Mouse Infarcted Hearts*. Cells, 2022. **12**(1).
208. King, S.E. and M.K. Skinner, *Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity Susceptibility*. Trends Endocrinol Metab, 2020. **31**(7): p. 478-494.

209. Arima, Y. and H. Fukuoka, *Developmental origins of health and disease theory in cardiology*. J Cardiol, 2020. **76**(1): p. 14-17.
210. Mottillo, S., et al., *The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2010. **56**(14): p. 1113-32.
211. Galli, A. and F. Lombardi, *Postinfarct Left Ventricular Remodelling: A Prevailing Cause of Heart Failure*. Cardiol Res Pract, 2016. **2016**: p. 2579832.
212. Dhalla, N.S., et al., *Cardiac remodeling and subcellular defects in heart failure due to myocardial infarction and aging*. Heart Fail Rev, 2012. **17**(4-5): p. 671-81.
213. Tune, J.D., et al., *Cardiovascular consequences of metabolic syndrome*. Transl Res, 2017. **183**: p. 57-70.
214. Souza, L.L., E.G. Moura, and P.C. Lisboa, *Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring*. Nutrients, 2022. **14**(10).
215. Collden, G., E. Caron, and S.G. Bouret, *Neonatal leptin antagonism improves metabolic programming of postnatally overnourished mice*. Int J Obes (Lond), 2022. **46**(6): p. 1138-1144.
216. Kanno, S., et al., *Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction*. J Am Soc Echocardiogr, 2002. **15**(6): p. 601-9.
217. Bayat, H., et al., *Progressive heart failure after myocardial infarction in mice*. Basic Res Cardiol, 2002. **97**(3): p. 206-13.
218. Benavides-Vallve, C., et al., *New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41691.
219. Sam, F., et al., *Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(1): p. H422-8.
220. Bruss, Z.S. and A. Raja, *Physiology, Stroke Volume*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
221. Hartupee, J. and D.L. Mann, *Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction*. Nat Rev Cardiol, 2017. **14**(1): p. 30-38.
222. Fujisue, K., et al., *Colchicine Improves Survival, Left Ventricular Remodeling, and Chronic Cardiac Function After Acute Myocardial Infarction*. Circ J, 2017. **81**(8): p. 1174-1182.
223. Wu, Q.Q., et al., *Mechanisms contributing to cardiac remodelling*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(18): p. 2319-2345.
224. van den Borne, S.W., et al., *Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 273-82.
225. Wang, L.W., et al., *High-Frequency Echocardiography - Transformative Clinical and Research Applications in Humans, Mice, and Zebrafish*. Circ J, 2018. **82**(3): p. 620-628.
226. Lister, N.B., et al., *Child and adolescent obesity*. Nat Rev Dis Primers, 2023. **9**(1): p. 24.
227. Plagemann, A., et al., *Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2012. **26**(5): p. 641-53.
228. Larque, E., et al., *From conception to infancy - early risk factors for childhood obesity*. Nat Rev Endocrinol, 2019. **15**(8): p. 456-478.
229. van de Bor, M., *Fetal toxicology*. Handb Clin Neurol, 2019. **162**: p. 31-55.
230. Wang, H., et al., *Natural Heart Regeneration in a Neonatal Rat Myocardial Infarction Model*. Cells, 2020. **9**(1).
231. Leu, M., E. Ehler, and J.C. Perriard, *Characterisation of postnatal growth of the murine heart*. Anat Embryol (Berl), 2001. **204**(3): p. 217-24.
232. Padula, S.L., N. Velayutham, and K.E. Yutzey, *Transcriptional Regulation of Postnatal Cardiomyocyte Maturation and Regeneration*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(6).
233. Neary, M.T., et al., *Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **74**(100): p. 340-52.
234. Paredes, A., et al., *gamma-Linolenic acid in maternal milk drives cardiac metabolic maturation*. Nature, 2023. **618**(7964): p. 365-373.

235. Cao, T., et al., *Fatty Acid Oxidation Promotes Cardiomyocyte Proliferation Rate but Does Not Change Cardiomyocyte Number in Infant Mice*. *Front Cell Dev Biol*, 2019. **7**: p. 42.
236. Nakamura, M.T., B.E. Yudell, and J.J. Loor, *Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids*. *Prog Lipid Res*, 2014. **53**: p. 124-44.
237. Tan, J., et al., *The role of short-chain fatty acids in health and disease*. *Adv Immunol*, 2014. **121**: p. 91-119.
238. Bellezza, I., et al., *Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018. **1865**(5): p. 721-733.
239. Singh, C.K., et al., *The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling*. *Antioxid Redox Signal*, 2018. **28**(8): p. 643-661.
240. Matsushima, S. and J. Sadoshima, *The role of sirtuins in cardiac disease*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **309**(9): p. H1375-89.
241. Sefcikova, Z., et al., *Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests*. *Physiol Res*, 2011. **60**(2): p. 337-46.
242. Bloom, M.W., et al., *Heart failure with reduced ejection fraction*. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. **3**: p. 17058.
243. Pezel, T., et al., *Imaging Interstitial Fibrosis, Left Ventricular Remodeling, and Function in Stage A and B Heart Failure*. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2021. **14**(5): p. 1038-1052.
244. Xu, L., et al., *Cardiac remodelling predicts outcome in patients with chronic heart failure*. *ESC Heart Fail*, 2021. **8**(6): p. 5352-5362.
245. Borovac, J.A., et al., *Sympathetic nervous system activation and heart failure: Current state of evidence and the pathophysiology in the light of novel biomarkers*. *World J Cardiol*, 2020. **12**(8): p. 373-408.
246. Mishra, P.K., et al., *Guidelines for evaluating myocardial cell death*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019. **317**(5): p. H891-H922.
247. Koletzko, B., et al., *The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations*. *J Perinat Med*, 2008. **36**(1): p. 5-14.
248. Innis, S.M., *Metabolic programming of long-term outcomes due to fatty acid nutrition in early life*. *Matern Child Nutr*, 2011. **7 Suppl 2**(Suppl 2): p. 112-23.
249. Dai, Y., et al., *Effects of postnatal overfeeding and fish oil diet on energy expenditure in rats*. *Pediatr Res*, 2018. **83**(1-1): p. 156-163.
250. Rider, O.J., A.J. Lewis, and S. Neubauer, *Structural and Metabolic Effects of Obesity on the Myocardium and the Aorta*. *Obes Facts*, 2014. **7**(5): p. 329-338.
251. Powell, B.D., et al., *Association of obesity with left ventricular remodeling and diastolic dysfunction in patients without coronary artery disease*. *Am J Cardiol*, 2006. **98**(1): p. 116-20.
252. Zhu, F., et al., *Adult Cardiomyocyte Proliferation: a New Insight for Myocardial Infarction Therapy*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021. **14**(3): p. 457-466.
253. Lopaschuk, G.D., et al., *Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure*. *Circ Res*, 2021. **128**(10): p. 1487-1513.
254. Auchampach, J., et al., *Measuring cardiomyocyte cell-cycle activity and proliferation in the age of heart regeneration*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2022. **322**(4): p. H579-H596.
255. Boswell, C.A., et al., *Comparative physiology of mice and rats: radiometric measurement of vascular parameters in rodent tissues*. *Mol Pharm*, 2014. **11**(5): p. 1591-8.

ANNEXES

I. Communications orales

M. Josse, E. Rigal, S. Guner, N. Rosenblatt, F. Rochais, G. Dogon, L. Rochette, M. Zeller, C. Vergely. Influence of postnatal overfeeding on postnatal heart development in juvenile mice. Printemps de la Cardiologie, Marseille 2023.

M. Josse, E. Rigal, G. Dogon, I. Porcherot, L. Rochette, M. Zeller, C. Vergely. Evaluation de la fonction ventriculaire gauche après infarctus du myocarde chez la souris adulte suralimentée postnatalement. Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon 2022.

M. Josse, **E. Rigal**, G. Dogon, I. Porcherot, L. Rochette, M. Zeller, C. Vergely. Echocardiographic measurement of left ventricular function following myocardial infarction in adult postnatally overfed mice. Printemps de la Cardiologie, Tours 2022.

II. Communications affichées

M. Josse, E. Rigal, G. Dogon, I. Porcherot, L. Rochette, M. Zeller, C. Vergely-Vandriessse. Echocardiographic measurement of left ventricular function following myocardial infarction in adult postnatally overfed mice. e-Forum des Jeunes Chercheurs, 2021.

M. Josse, E. Rigal, G. Dogon, I. Porcherot, L. Rochette, M. Zeller, C. Vergely-Vandriessse. Evaluation of left ventricular function following myocardial infarction in adult postnatally overfed mice. e-Printemps de la Cardiologie, 2021.

M. Josse, G. Coulis, A. Bergeron, Y. Shi, D.P. Labbé, M.L. Tremblay, C. Vergely-Vandriessse, G. Karsenty, B. Boivin. Characterization of transcriptional regulation by thyroid hormone T3 in hearts of PTP1B cardiac knockout mice in cardiac hypertrophy. e-Printemps de la Cardiologie 2020.

III. Liste des publications

M. Josse, E. Rigal, N. Rosenblatt-Velin, L. Rochette, M. Zeller, C. Guenancia and C. Vergely. Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 9427.

IV. Enseignements

2022-2023 : Travaux pratiques (TP = 20h) de biochimie « Techniques en Biochimie et Biologie Moléculaire » (TBBM), aux étudiants de licence 2 au sein de l'UFR SVTE. Section CNU : 64.

2021-2022 : Travaux pratiques (TP=16h) de biochimie « Techniques en Biochimie et Biologie Moléculaire » (TBBM), aux étudiants de licence 2 au sein de l'UFR SVTE. Section CNU : 64.

2020-2021 : Travaux pratiques (TP=12h) de biochimie « Techniques en Biochimie et Biologie Moléculaire » (TBBM) aux étudiants de licence 2 au sein de l'UFR SVTE. Section CNU : 64.



Titre : Influence de l'environnement nutritionnel précoce sur le développement et le risque cardiovasculaire

Mots clés : Suralimentation postnatale, infarctus du myocarde, insuffisance cardiaque, prolifération

Résumé : Il est reconnu que l'environnement nutritionnel intra-utérin et postnatal immédiat joue un rôle essentiel dans le développement du syndrome métabolique à l'âge adulte. Néanmoins, des altérations métaboliques et cardiaques précoces pourraient également apparaître. Chez la souris, une suralimentation postnatale (SA) a été induite après la naissance par diminution de la taille de la portée. Une hausse du poids corporel a été observée dès l'âge de 7 jours et a été maintenue à l'âge adulte après avoir reçu un régime standard identique aux souris contrôles. La SA était associée à une diminution de la prolifération postnatale des cardiomyocytes ainsi qu'à une réduction du nombre de cardiomyocytes au sevrage. Des changements précoces d'acides gras circulants ont également été mis en évidence.

A l'âge adulte, les souris ont été soumises à un infarctus du myocarde afin d'étudier le rôle de la SA dans le développement d'une insuffisance cardiaque. De façon surprenante, malgré une fraction d'éjection basale diminuée et une aire télésystolique augmentée chez les souris SA par rapport aux contrôles, aucune différence de la fonction systolique ni diastolique n'a été mise en évidence, jusqu'à 6 mois après l'infarctus. Ainsi, les modifications cardiaques et métaboliques induites par la SA, seulement pendant quelques jours après la naissance, pourraient être à l'origine d'altérations de la fonction cardiaque à l'âge adulte. Cependant, l'agressivité du modèle expérimental d'infarctus du myocarde pourrait être trop importante pour mettre en évidence un effet néfaste de la SA en condition pathologique.

Title: Impact of early nutritional environment on cardiovascular development and risk

Keywords: Postnatal overfeeding, myocardial infarction, heart failure, proliferation

Abstract: It is well recognized that intrauterine and immediate postnatal environment plays a role in metabolic syndrome development in adulthood. Nevertheless, early metabolic and cardiovascular alterations could also be observed. Postnatal overfeeding (PNOF) was induced, in mice, by litter size reduction. A body weight increase was noticed as soon as 7 days after birth and was maintained in adulthood after receiving the same standard diet as control mice. PNOF was associated with a reduction of postnatal cardiomyocytes' proliferation as well as a decreased number of cardiomyocytes in the heart at weaning. Early circulating fatty acids changes were also evidenced. Adult mice were submitted to myocardial infarction in order to

study the impact of PNOF on heart failure development. Surprisingly, despite a reduced basal left ventricular ejection fraction and increased telesystolic area in PNOF mice compared to control mice, no differences regarding the systolic and diastolic function were observed, up to 6 months after myocardial infarction. In conclusion, the metabolic and cardiac modifications induced by PNOF, only a few days after birth, could be responsible for alterations of cardiac function in adult mice. However, due to its aggressive aspects the experimental model of myocardial infarction could not be adequate to highlight negative effects of PNOF in pathological conditions.