

Université de Montréal

**Conséquences d'une restriction de croissance intra-utérine
et du sexe biologique sur le métabolisme des acides gras
dans les cardiomyocytes de rats fœtaux**

par
Cynthia Gravel

Département de physiologie moléculaire et intégrative
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc)
en physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Mai 2015

© Cynthia Gravel, 2015

Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Conséquences d'une restriction de croissance intrautérine
et du sexe biologique sur le métabolisme des acides gras
dans les cardiomyocytes de rats foetaux**

Présenté par :

Cynthia Gravel

A été évalué par un jury composé des membres suivants :

Céline Fiset, PhD

Président-rapporteur

Michèle Brochu, PhD

Directrice de recherche

Philippe Comtois, PhD

Membre du jury

Résumé

Il est désormais accepté qu'un environnement fœtal défavorable prédispose à des maladies chroniques qui surviennent à l'âge adulte. Il a été démontré dans notre laboratoire qu'une diminution de perfusion placentaire induit une redistribution du débit sanguin vers le cœur chez le fœtus ainsi qu'une restriction de croissance intrautérine. De plus, un remodelage et une diminution de la contractilité des cardiomyocytes ont été observés chez les femelles devenues adultes. En période périnatale, l'utilisation des acides gras comme substrat énergétique devient plus importante que celle du glucose au niveau des cardiomyocytes. Considérant qu'un mécanisme s'est mis en place *in utero*, nous émettons l'hypothèse que le transfert de la voie de l'utilisation du glucose vers l'utilisation des acides gras se fait plus tôt chez les fœtus en restriction de croissance. L'objectif de cette étude est de mesurer, dans les cœurs fœtaux, les constituants du métabolisme des acides gras, soit le transporteur principal des acides gras, la carnitine palmitoyltransférase-1- α , ainsi que ses protéines associées soit l'acyl-CoenzymeA synthétase-1 et le canal anionique voltage-dépendant de type 1. Nous mesurerons l'activité du cytochrome c oxydase et le nombre de mitochondries. L'influence du sexe et la condition fœtale (restriction de croissance intrautérine vs contrôle) seront comparés. Nous avons observé que l'expression protéique de la carnitine palmitoyltransférase-1 α et de l'acyl-CoenzymeA synthétase-1 est significativement augmentée, mais pas celle du canal anionique voltage-dépendant de type 1, dans les cœurs de fœtus en restriction de croissance intrautérine femelles. Le nombre et l'activité des mitochondries est semblable dans tous les groupes. Ces résultats suggèrent que la condition fœtale et le sexe altèrent la quantité du transporteur des acides gras, la carnitine palmitoyltransférase-1 α , au niveau traductionnel sans

toutefois affecter l'activité du cytochrome c oxydase et le nombre de mitochondries. À long terme, nos études permettront de mieux comprendre les conséquences et causes de la RCIU afin d'en permettre la prévention.

MOTS CLÉS

Diète faible en sodium, mitochondries, carnitine palmitoyltransferase-1-alpha, grossesse

Abstract

It is widely accepted that an adverse fetal environment predisposes to chronic diseases that occur in adulthood. In our laboratory, it has been shown that a decrease in placental perfusion induced blood flow redistribution to the heart in fetus as well as an intrauterine growth restriction. Furthermore, remodeling and decreased contractility of cardiomyocytes were observed in adult offspring females. In perinatal period, the use of fatty acids as an energy substrate becomes more important than glucose in cardiomyocytes. Whereas a mechanism is in place *in utero*, we proposed the hypothesis that the transfer from the use of glucose as fuel towards fatty acids occurs earlier in intrauterine growth restriction fetuses. The objective of this study is to measure, in fetal hearts, the components of fatty acid metabolism, the main carrier of fatty acids, carnitine palmitoyltransferase-1 α , and its associated proteins namely acyl-coenzymeA synthase-1 and voltage-dependant anion channel 1. We will measure the cytochrome c oxidase activity and the number of mitochondria. Influence of sex and fetal condition (intrauterine growth restriction vs control) will be compared. We observed that protein expression of carnitine palmitoyltransferase-1 α and acyl-coenzyme A synthetase long-chain 1 is significantly increased, but not that of the voltage-dependant anion channel 1, in hearts of female fetus IUGR. The number and the activity of mitochondria are similar in all the groups. These results suggest that fetal condition and sex alter the quantity of the acid transporter carnitine palmitoyltransferase-1 α has at the translation level without affecting the activity of the cytochrome c oxidase and the number of mitochondria.

KEYWORDS

Low-sodium diet, mitochondria, carnitine palmitoyltransferase-1-alpha, pregnancy

Table des matières

PAGE DE PRÉSENTATION DU MÉMOIRE	i
PAGE DE PRÉSENTATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ ET MOTS-CLÉS	iii
ABSTRACT AND KEYWORDS	v
TABLES DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX DU MÉMOIRE	ix
LISTE DES FIGURES DU MÉMOIRE	x
LISTE DES TABLEAUX DE L'ARTICLE	xi
LISTE DES FIGURES DE L'ARTICLE	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
DÉDICACE	xvii
REMERCIEMENTS	xviii
1. INTRODUCTION	1
1.1 Problématique.....	3
1.2 Restriction de croissance intrautérine.....	3
1.3 Origine développementale des maladies de l'adulte.....	4
1.3.1 Modèle utilisé pour étudier l'origine fœtale des maladies de l'adulte.....	7
1.4 Le sexe biologique.....	10
1.5 Le cœur.....	12
1.5.1 Développement et anatomie.....	12

1.5.2 Hypertrophie cardiaque	13
1.5.3 Muscle cardiaque vs muscle squelettique	15
1.5.4 Contraction	16
1.5.5 Mitochondries.....	18
1.5.5.1 Morphologie.....	18
1.5.5.2 Fonction de la signalisation calcique	20
1.5.5.3 Le processus de fission/fusion	21
1.6 Voies métaboliques.....	22
1.6.1 Métabolisme du glucose.....	24
1.6.2 La β -oxydation des acides gras	25
1.6.3 Cycle de Krebs	26
1.6.3.1 Carnitine palmitoyltransférase 1-alpha (CPT1 α)	26
1.6.3.2 Acyl-CoenzymeA synthétase à longue chaîne 1 (ACSL).....	29
1.6.3.3 Canal à anion voltage-dépendant 1 (VDAC1)	30
1.6.4 Chaîne de transport des électrons.....	30
1.7 Modèle de RCIU utilisé en laboratoire.....	33
1.8 Le rat comme modèle expérimental	35
1.9 Hypothèses et objectifs.....	36
2. ARTICLE	37
2.1 Résumé de l'article en français.....	39
2.2 Manuscrit.....	41

3. DISCUSSION	69
3.1 Point de vue sur les résultats obtenus	70
3.2 Limites expérimentales	76
3.3 Perspectives	78
4. BIBLIOGRAPHIE	80

Liste des tableaux du mémoire

Tableau 1. Analyse morphométrique et mesure de la contractilité des cardiomyocytes de femelles adultes témoins et RCIU	15
Tableau 2. Comparaison des poids des fœtus à terme – 1 jour entre 1998 et 2014, ainsi que la grandeur des contrôles vs RCIU	33
Tableau 3. Poids corporel total et poids ventriculaire de fœtus et d’adultes de 12 semaines séparés par sexe et par groupe d’étude	35

Liste des figures du mémoire

Figure 1 : Mécanisme suggéré impliqué dans l'hypertension suite à une programmation fœtale... 7	7
Figure 2 : Développement du cœur humain..... 13	13
Figure 3 : Coupe frontale macroscopique du cœur humain adulte 14	14
Figure 4 : Anatomie et histologie du tissu musculaire cardiaque 16	16
Figure 5 : Couplage excitation-contraction et relâchement du muscle cardiaque 17	17
Figure 6 : Mitochondrie 19	19
Figure 7 : Utilisation des substrats énergétiques lors du développement fœtal chez l'humain 23	23
Figure 8 : Glycolyse..... 24	24
Figure 9 : Schéma représentant le métabolisme des acides gras autour de CPT1 α 28	28
Figure 10 : Modèle proposé du complexe hétéro-oligomérique 29	29
Figure 11 : Chaîne de transport des électrons..... 32	32
Figure 12 : Ensemble des voies métaboliques 32	32

Liste des tableaux de l'article

Table 1. Western Blot details 60

Table 2. Primer designs used for RT-PCR..... 61

Liste des figures de l'article

Figure 1: CPT1 α [<i>CPT1a</i>] expression in heart of male and female fetuses	64
Figure 2: ACSL1 [<i>ACSL1</i>] expression in hearts of male and female fetuses.....	65
Figure 3: VDAC1 [<i>VDAC1</i>] expression in hearts of male and female fetuses	66
Figure 4: Gene expression of Mt_Cytb [<i>Mt_Cytb</i>] in hearts from male and female fetuses.....	67
Figure 5: Enzymatic activity of Cytochrome c oxidase in hearts of male and female fetuses	68

Liste des abréviations

ACC	Acétyl CoenzymeA carboxylase
ACS	Acétyl CoenzymeA synthétase
ACSL1	Acyl-CoenzymeA synthétase, membre 1 de la famille à longue chaîne – <i>Acyl-CoenzymeA synthetase long-chain family member 1</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	Protéine kinase activé par l'adénosine monophosphate – <i>Adenosine monophosphate activated protein kinase</i>
ANP	Peptide natriurétique auriculaire – <i>Atrial natriuretic peptide</i>
AOX	Acyl-CoA oxydase
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BPA	Bisphénol A
Ca ²⁺	Calcium
CACT	Carnitine-acylcarnitine translocase
CAT	Carnitine acyl transférase
CD36	Translocase d'acide gras – <i>Fatty acids translocase</i>
CoA	Coenzyme A
COX	Cytochrome c oxydase
COX IV	Cytochrome c oxydase sous-unité IV ou complexe IV
CPT1c	Carnitine O-Palmitoyl transférase 1-c (neuronal) – <i>Carnitine O-Palmitoyltransferase 1-c (Brain)</i>
CPT1α	Carnitine O-Palmitoyl transférase 1-alpha (foie) – <i>Carnitine O-Palmitoyltransferase 1-alpha (Liver)</i>
<i>CPT1α</i>	Gène de CPT1α, foie – <i>CPT1α gene</i>
CPT1β	Carnitine O-Palmitoyl transférase 1-bêta (muscle)
CPT2	Carnitine O-Palmitoyltransférase 2 (Muscle)
Drp1	Protéine apparentée aux dynamine 1 – <i>Dynamin-related protein 1</i>

Er α	Récepteur des œstrogène α – <i>Estrogen receptor α</i>
Er β	Récepteur des œstrogènes β – <i>Estrogen receptor β</i>
FA	Acides gras – <i>Fatty acids</i>
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide hydroquinone
FAS	Synthase d'acides gras – <i>Fatty acids synthase</i>
Fis 1	Fission 1
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GLUT1	Transporteur de glucose 1 – <i>Glucose transporter 1</i>
GLUT11	Transporteur de glucose 11 – <i>Glucose transporter 11</i>
GLUT12	Transporteur de glucose 12 – <i>Glucose transporter 12</i>
GLUT4	Transporteur de glucose 4 – <i>Glucose transporter 4</i>
GTPase	Guanosine triphosphatase – <i>Guanosine triphosphatase</i>
H ₂ O	Molécule d'eau
IGF2	Facteur de croissance analogue à l'insuline 2 – <i>Insulin-like growth factor 2</i>
IMM	Membrane mitochondriale interne – <i>Inner mitochondrial membrane</i>
IP	Immunoprécipitation
LCFA	Acides gras à longue chaîne – <i>Long chain fatty acids</i>
MCD	Malonyl CoenzymeA décarboxylase
MCU	Uniport de calcium mitochondrial – <i>Mitochondrial calcium uniporter</i>
mHCX	Échangeur mitochondrial H ⁺ /Ca ²⁺ – <i>Mitochondrial H⁺/Ca²⁺ exchanger</i>
mNCX	Échangeur mitochondrial Na ⁺ /Ca ²⁺ – <i>Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>
Mt-Cytb	Cytochrome b mitochondrial – <i>Mitochondrial cytochrome b</i>
<i>Mt-Cytb</i>	Gène de Mt-Cytb – <i>Mt-Cytb gene</i>
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase
OMM	Membrane mitochondriale externe – <i>Outer mitochondrial membrane</i>
Opa1	Protine d'atrophie optique 1 – <i>Optic atrophy 1 protein</i>
Orai1	Protéine du canal calcique activée par la libération du calcium 1 – <i>Calcium release-activated calcium channel protein 1</i>

PCR	Réaction en chaîne par polymérase – <i>Polymerase chain reaction</i>
PGC-1	Co-Activateur du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes gamma – <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i>
<i>PGK2</i>	Gène de PGK2 – <i>PGK2 gene</i>
PGK2	Phosphoglycérate kinase 2
<i>PolR2a</i>	Gène de PolR2a – <i>PolR2a gene</i>
PolR2a	Polymérase (ARN) II (ADN dirigée) polypeptide A – <i>Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A</i>
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes – <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPAR α	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes alpha – <i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PPAR β/δ	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes bêta/delta – <i>Peroxisome proliferator-activated receptor bêta/delta</i>
PPAR γ	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes gamma – <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPRE	Élément de réponse aux proliférateurs de peroxysomes – <i>PPAR response element</i>
PTP	Pore de transition perméable – <i>Permeability transition pore</i>
qPCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative – <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	Réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel – <i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RCIU	Restriction de croissance intrautérine
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène – <i>Reactive oxygen species</i>
RPL4	60S Protéine ribosomale L4 – <i>60S Ribosomal protein L4</i>
<i>RPL4</i>	Gène de RPL4 – <i>RPL4 gene</i>
RS	Réticulum sarcoplasmique
RXR	Récepteur X des rétinoïdes – <i>Retinoid X receptor</i>
STIM	Molécule d'interaction stromale – <i>Stromal interaction molecule</i>

SWS	Sondage sur les femmes de Southampton – <i>Southampton Women's survey</i>
VDAC1	Canal anionique voltage-dépendant de type 1 – <i>Voltage-dependent anion channel 1</i>
Wnt2	Site d'intégration familiale MMTV de type Wingless, membre 2 – <i>Wingless-type MMTV integration site family, member 2</i>

*À mon mari,
ton support a été précieux,
car je sais que nous ne faisons qu'un.*

Remerciements

J'aimerais remercier Michèle Brochu, ma directrice de recherche, qui m'a permis de monter ce projet par moi-même et qui m'a soutenue dans les périodes difficiles de ce travail. Elle a cru en mes capacités et m'a permis de me surpasser en m'encourageant à devenir plus autonome. Merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire !

Un énorme merci à Benoit Sicotte, l'assistant de laboratoire. Il a toujours été là pour répondre à mes questions et pour m'aider à mieux comprendre ce que je faisais. Il m'a encouragée dans toutes mes idées et ce, même s'il ne connaissait pas en profondeur toutes les nouvelles techniques que je voulais développer en laboratoire.

Merci à mes collègues de laboratoire Ève, Emilie et Yasmine avec qui j'ai partagé mes deux années de maîtrise. Nous avons développé une très belle amitié qui, je l'espère, pourra perdurer. Nos échanges et vos encouragements m'ont été très précieux et je garde d'excellents souvenirs de cette période de ma vie. Je vous adore!

Je tiens à remercier mon mari Nicholas. Sans lui, la maîtrise n'aurait pas été aussi agréable. Il m'a appris à aimer et à mieux comprendre ce que je faisais en étant une source d'écoute sans pareil. Il a su me dire les bons mots pour m'encourager et me soutenir. Malgré la distance qui nous a séparés tout ce temps, la fin de cette maîtrise nous permettra de nous réunir enfin. Je t'aime !

À ma famille. Merci de votre soutien moral et familial. Votre présence m'a permis de prendre du temps pour moi afin de revenir en force. Merci d'être ma famille !

Merci aux IRSC pour leur soutien financier sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour. Merci à l'Université de Montréal et au Département de physiologie moléculaire et intégrative. Et merci à tous ceux que j'aurais pu oublier qui m'ont encouragée de près ou de loin dans cette grande étape de ma vie. Je termine avec une plus grande sagesse et beaucoup de connaissances.

1. Introduction

Depuis le début des années 2000, il est de plus en plus accepté qu'outre la génétique, l'environnement fœtal, c'est-à-dire les conditions dans lesquelles le fœtus se développe, entraîne des conséquences sur sa santé à l'âge adulte. Il a été démontré que des conditions fœtales défavorables comme la malnutrition de la mère, une mauvaise invasion trophoblastique ou une diminution de perfusion placentaire peuvent entraîner des maladies cardiovasculaires ou endocriniennes à l'âge adulte. Un modèle où une diminution de perfusion placentaire conduisant à une restriction de croissance intrautérine (RCIU) chez le rat a été développé. Dans ce modèle, la mesure des dimensions des cardiomyocytes chez les femelles à l'âge adulte, a démontré un remodelage cardiaque associé à une diminution de contractilité des cardiomyocytes (Battista et al., 2005). Toutefois, comme les mesures ont été prises sur les cardiomyocytes, nous ne pouvons déterminer précisément le type de remodelage cardiaque.

Mon projet de maîtrise vise à déterminer, dans ce modèle de RCIU, quels pourraient être les mécanismes mis en place dans le cœur fœtal conduisant aux altérations observées à l'âge adulte. Je me suis principalement intéressée au métabolisme des acides gras. Dans le présent mémoire, une revue de littérature sur la RCIU, les modèles animaux, le cœur et le métabolisme énergétique sera suivie de la présentation de mes travaux sous forme d'article. Finalement, une discussion et des perspectives pour la suite du projet seront présentées.

1.1 Problématique

Chaque année au Canada, 5 à 8% des nouveaux-nés ont subi une restriction de croissance intra-utérine (RCIU). Ils sont identifiés par leur faible poids à la naissance pour leur âge gestationnel, c'est-à-dire moins de 2500 g (ACOG, 2013, Canada, 2008). Les causes sont multiples, elles peuvent être d'origine maternelle (malnutrition, toxicité par l'alcool ou le tabac, stress, maladie vasculaire ou chronique, etc), fœtale (anomalie génétique, infection, grossesse multiple) ou utéroplacentaire (diminution de perfusion, hypotrophie placentaire à prédominance villositaire, anomalie des artères villositaires ou placenta extra-chorial) (Johnson and Everitt, 2002, Bigot and Fournie, 2011). Toutefois, environ 30% des RCIUs sont de sources idiopathiques. En plus de la morbidité et mortalité néonatales qui augmentent les coûts du système de santé, il est désormais accepté que l'environnement fœtal peut avoir des conséquences à long terme telles que des maladies cardio-vasculaires, du diabète non insulino-dépendant ou de l'hypertension (Johnson and Everitt, 2002). L'étude approfondie du fonctionnement *in utero* permettra à long terme de contrecarrer les effets de l'environnement fœtal défavorable.

1.2 Restriction de croissance intrautérine

Il existe deux types de RCIU. Elle peut être symétrique ou bien asymétrique. La première est une diminution de croissance qui touche plusieurs organes tels que l'abdomen, les membres et le périmètre céphalique de façon homogène conduisant à une faible taille et un

petit poids global du fœtus. Elle survient plus tôt au cours de la grossesse. La RCIU asymétrique quant à elle apparaît plus tardivement, soit à la fin du 3^e trimestre. Elle comporte des atteintes de manière disproportionnée et touche plus particulièrement la taille et l'abdomen de façon diminuée en conservant un périmètre crânien normal. Ceci est dû au fait que le débit cardiaque se redistribue majoritairement vers les organes essentiels tels que le cœur et le cerveau. Il s'agit d'une adaptation du fœtus afin de survivre. Le pronostic est meilleur que dans le premier cas (Bigot and Fournie, 2011). Plusieurs modèles animaux ont été développés pour induire une RCIU, soit en assignant une diète faible en protéines, en graisses, en vitamines, en nutriments ou en calories ou en créant un environnement hypoxique, stressant ou encore en présence de drogues. Chacun de ces modèles possède des limitations et quelques-uns d'entre eux seront détaillés dans les prochaines sections.

1.3 Origine développementale des maladies de l'adulte

Dans les années 1980, le professeur David Barker, épidémiologiste, a démontré une plus grande incidence de maladies coronariennes à l'âge adulte chez les gens ayant eu un faible poids à la naissance (Barker, 1995). Il a donc proposé la théorie de programmation fœtale ou plus récemment d'origine développementale des maladies de l'adulte. Cette théorie soutient que des facteurs environnementaux survenant durant les périodes critiques du développement fœtal peuvent induire des altérations au niveau structurel ou fonctionnel dans les organes et que cela prédispose à des maladies associées à l'âge adulte comme les maladies cardiovasculaires, le diabète ou l'obésité (Byrne and Phillips, 2000).

Plusieurs études confirment l'hypothèse de Barker concernant l'influence de l'environnement fœtal non seulement sur les maladies coronariennes (Heijmans et al., 2008, Forsén et al., 1999), mais aussi sur les ischémies cardiaques (A. Leon et al., 1998) et le diabète de type 2 (Liguori et al., 2010).

Par exemple, une étude prospective de suivi de grossesse, le *Southampton Women's survey* (SWS), où l'on notait des informations concernant la nutrition, l'environnement, le partenaire, les parents, les habitudes de vies, etc. a été effectué de 1998 à 2005 (Inskip et al., 2006). Ils ont démontré que la masse osseuse à 4 ans peut être déduite dès le début de la grossesse, entre 11 et 19 semaines, et que le développement squelettique se produit à cette période. Ainsi, une perturbation à ce stade fœtal influencerait le statut osseux chez l'enfant (Harvey et al., 2012).

Pour expliquer ce lien entre l'environnement fœtal et les maladies adultes, plusieurs se sont intéressés à l'épigénétique qui suggère que l'environnement et les habitudes de vie d'une personne peuvent influencer la régulation des gènes et les mécanismes moléculaires au niveau du génome sans même altérer la composition de l'ADN. Ces changements peuvent être transmis d'une génération à une autre, mais peuvent toutefois être réversibles (Dunn and Bale, 2011, Sharpe and Franks, 2002). Il peut s'agir, entre autres, d'une méthylation de l'ADN (Wu et al., 2004, Heijmans et al., 2008), d'une modification des histones (MacLennan et al., 2004, Zheng et al., 2011), d'un remodelage de la chromatine (MacLennan et al., 2004) ou d'une répression transcriptionnelle (Karen A. Lillycrop and Burdge, 2005). Par exemple, certaines études ont démontré que la malnutrition et le jeune âge maternel pouvaient être associés à une méthylation de gènes affectant la gamétogenèse des bébés et ainsi avoir des conséquences sur

leur fertilité (Unterberger et al., 2009, Dunn and Bale, 2011, Sharpe and Franks, 2002). De plus, une étude avec une cohorte d'individus nés de mères ayant subi la famine en Europe durant la 2^e Guerre Mondiale lors de leur grossesse a démontré une diminution de la méthylation de l'ADN sur le gène maternel *IGF2*, étant le facteur de croissance le plus important au niveau placentaire et chez le fœtus (Heijmans et al., 2008). Également, une étude menée au Pays-Bas a démontré une plus grande susceptibilité aux maladies coronariennes (Painter et al., 2006). De manière plus spécifique, une autre étude a contrôlé la quantité de protéines données aux mères et a étudié le gène *Wnt2* (site d'intégration familiale MMTV de type Wingless, membre 2) dans les placentas de bovins RCIU. Ce gène est reconnu pour être un important régulateur de l'implantation embryonnaire ainsi que du développement placentaire chez le mouton, la souris et l'humain. Une diminution de l'expression génique de *Wnt2* dans les placentas de RCIU leur a permis d'émettre l'hypothèse que la diminution du poids placentaire (Sonderregger et al., 2010, Hayashi et al., 2007) serait due à une méthylation du promoteur du gène étudié (Lu et al., 2013). Selon eux, cela supporterait l'hypothèse du rôle clé de la nutrition de la mère dans l'épigénome néonatal (Reamon-Buettner et al., 2014).

En résumé, un environnement fœtal défavorable peut entraîner des conséquences aussi différentes qu'une maladie coronarienne (Heijmans et al., 2008, Forsén et al., 1999) et qu'une diminution du nombre de néphron dans le rein (Buffat et al., 2007). Également, il peut interagir sur des mécanismes tel que l'expression génique du récepteur des glucocorticoïdes (Karen A. Lillycrop and Burdge, 2005). La figure 1 démontre un exemple de mécanisme induit *in utero*, soit l'augmentation des corticostéroïdes, et qui conduit à l'hypertension à l'âge adulte. La programmation fœtale influence plusieurs facteurs qui conduisent, à long-terme, à des conséquences pouvant affecter la qualité de vie de la progéniture.

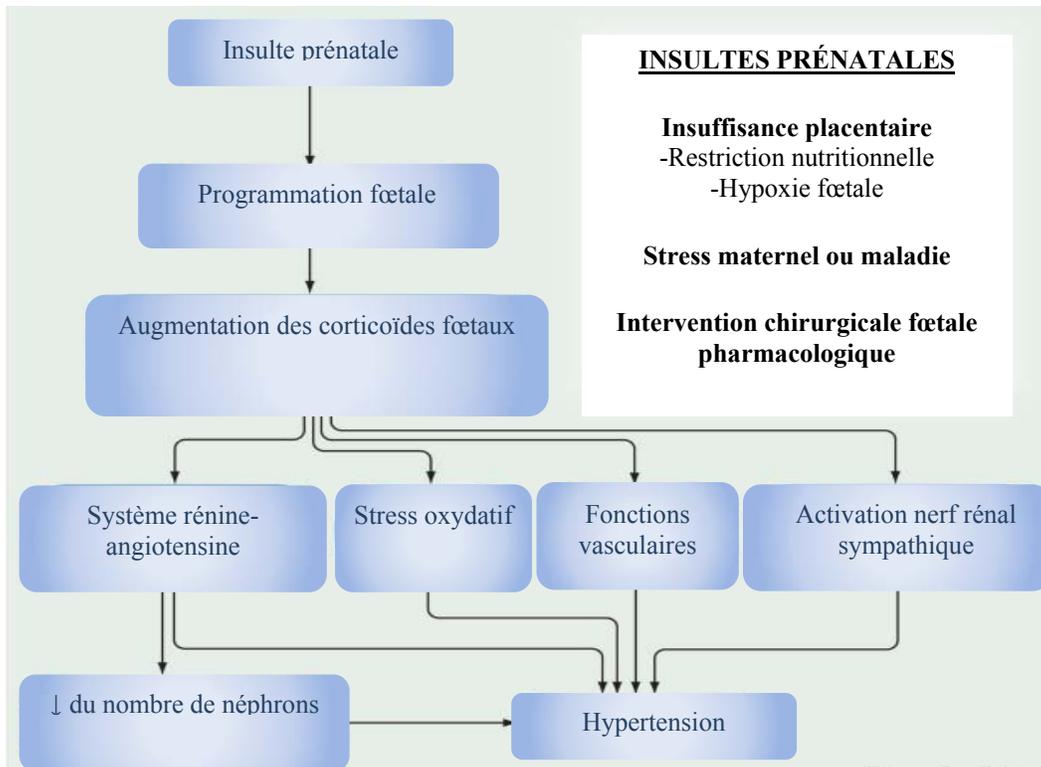


Figure 1 : Mécanisme suggéré impliqué dans l’hypertension suite à une programmation fœtale. Adapté de (Ojeda et al., 2008)

1.3.1 Modèle utilisé pour étudier l’origine fœtale des maladies adultes

La plupart des modèles utilise une restriction de nourriture soit en quantité ou en protéine chez la mère (Lim et al., 2006, Karen A. Lillycrop and Burdge, 2005, Menendez-Castro et al., 2011, Reamon-Buettner et al., 2014, Zheng et al., 2011, Cheema et al., 2007, Kwong et al., 2000, Unterberger et al., 2009). Toutefois, des diètes modifiées ont aussi été utilisées. En donnant une diète contenant du lard à des rates Sprague-Dawley gestantes, une

dysfonction endothéliale et une pression artérielle ont été observées dans la progéniture femelle (Ghosh et al., 2001, Khan et al., 2002). De plus, une réduction des acides arachidoniques et docosahexaénoïques dans l'aorte a été remarquée dans les fractions d'éthanolamine et de phosphoglycérides. (Ghosh et al., 2001). Ils stipulent donc qu'une diète riche en lard donnée aux rates gestantes conduit à des dysfonctions cardiovasculaires reliées au sexe chez la progéniture.

Une diète faible en protéine (caséine) donnée tout au long de la grossesse à des rates Wistar cause une RCIU chez les bébés (Menendez-Castro et al., 2011). Dès la naissance, ils sont nourris normalement jusqu'à 70 jours. Une altération dans le profil d'expression des gènes pro-fibrotiques et dans la structure des vaisseaux et du cœur à l'adolescence (70 jours) a été remarqué, ce qui confirmait leur hypothèse (Menendez-Castro et al., 2011). Une diminution de la contractilité du myocarde chez les RCIU a aussi été observée (Menendez-Castro et al., 2014). Une diète faible en protéine peut aussi entraîner des anomalies au niveau des blastocystes détecté par l'index mitotique quatre jours suivant l'implantation. Dans ce groupe, la pression artérielle est plus augmentée que dans le groupe témoin chez les mâles et ce, proportionnellement à l'âge de l'animal (Kwong et al., 2000), mais il a également été démontré qu'une telle diète prédispose à l'hypertension, aux arythmies cardiaques ou aux infarctus (Hu et al., 2000, T. Ozaki, 2001). Au niveau cardiaque, une diminution du nombre de cardiomyocytes a également été observée à la naissance (Corstius et al., 2005) sans doute relié à l'augmentation de l'apoptose (Cheema et al., 2007). Une autre étude faite sur des rates femelles ayant subi une RCIU démontre que ces conséquences peuvent être dues à l'augmentation de la fibrose interstitielle dans le ventricule gauche (Lim et al., 2006). De plus,

en étudiant la réactivité vasculaire dans des bains à organe isolé, une augmentation de la sensibilité au potassium a été observée chez les mâles (T. Ozaki, 2001).

L'induction d'une hypoxie au niveau fœtal entraîne des complications semblables à celles retrouvées lors d'une restriction nutritive. Pour ce faire, la mère est mise dans une cage isolée avec infusion d'azote continue du 15^e au 21^e jour de gestation afin de réduire l'accès à l'oxygène à 12% au lieu de 21%. Il a été démontré qu'à 4 mois et à 12 mois, les mâles nés RCIU avaient un poids inférieur aux contrôles et présentaient tous des signes d'hypertrophie ventriculaire gauche. De plus, les mâles autant que les femelles de 12 mois présentaient des signes de dysfonction diastolique ventriculaire gauche ainsi qu'une hypertension pulmonaire *in vivo* et *ex vivo* (Rueda-Clausen et al., 2009). Les agents toxiques tels que la cocaïne et la cigarette peuvent également créer un environnement hypoxique. L'injection intraveineuse de cocaïne à des brebis gestantes ou directement aux fœtus (0,5, 1,0, ou 2,0 mg/kg) induit une résistance utérine vasculaire affectant l'oxygénation fœtale. Cette hypoxie s'accompagne également d'une hypertension artérielle et d'une tachycardie chez le fœtus dû à l'augmentation des niveaux de catécholamines (James R. Woods, 1987). Des données obtenues entre 1992 et 2002 chez des femmes ayant donné naissance à des enfants de faible poids ont démontré que 17,6% fumaient en moyenne deux cigarettes par jour et que 26,9% ont eu un bébé ayant une sévère atteinte de croissance (Koch et al., 2012). Un effet vasoactif dû à la nicotine a également été remarqué. Pour mieux comprendre le mécanisme, il a été proposé que le dioxyde de carbone dans le sang de la mère, suite à la prise de cigarette, passe la barrière placentaire et se lie à l'hémoglobine fœtale qui crée une hypoxie (Longo, 1977, Lambers and Clark, 1996).

Tous ces modèles de RCIU sont fréquents et mènent à de très grandes complications qui peuvent toutefois varier entre les mâles et les femelles. Plusieurs études se consacrent uniquement aux mesures prises sur des mâles ou ne font tout simplement pas la distinction entre les deux sexes. Pour notre part, nous distinguons les différents sexes dans un modèle où une restriction sodique induit une diminution du volume circulant et qui sera décrit ultérieurement.

1.4 Le sexe biologique

En effet, il est connu que les maladies cardiovasculaires ont une plus grande incidence chez les hommes et les femmes ménopausées. Les œstrogènes auraient un effet modulateur sur l'endothélium et les cellules circulantes telles que les globules blancs, les érythrocytes et les plaquettes qui sont impliquées dans l'inflammation vasculaire et le développement des maladies cardiovasculaires (Villar et al., 2008, Mahmoodzadeh et al., 2012).

Afin de démontrer l'effet du sexe sur l'adaptation du cœur à l'exercice, des roues ont été placées dans les cages de souris mâles et femelles. Les animaux pouvaient y courir de façon volontaire. Après huit semaines, une hypertrophie du myocarde a été observée dans les deux sexes mais de façon plus importante chez les femelles (Dworatzek et al., 2014). Les paramètres d'échocardiographie ainsi que le diamètre des cardiomyocytes ont permis de constater l'hypertrophie. Deux groupes expérimentaux ont été étudiés. Le premier groupe était de type normal avec récepteur des œstrogènes alphas ($ER\alpha$) et bêta ($ER\beta$) et le deuxième

groupe de type mutant pour les gènes ER α et ER β , donc sans ces récepteurs. Après l'exercice, ils ont pu observer un remodelage mitochondrial chez les femelles de type normal contrairement aux mâles et aux femelles ER $\alpha^{-}/$ ER β^{-} . Cette étude suggère donc que la réponse du cœur à l'exercice agit de façon spécifique au sexe et est modulée par les récepteurs aux œstrogènes. (Dworatzek et al., 2014). Un groupe de chercheurs, examinant les effets néfastes du bisphénol A (BPA) sur les fonctions cardiovasculaires de manière spécifique au sexe des souris CD-1, appuie l'importance de différencier les sexes. Les souris gestantes ont reçu deux diètes différentes, soit au BPA ou au 17 α -éthynyl estradiol (EE) toutes deux à concentrations variables. Suite à la parturition, la progéniture, séparée en groupes, a suivi les mêmes diètes jusqu'à l'âge d'environ 8 à 10 semaines où les données ont été recueillies. Par un électrocardiogramme, une diminution de la pression artérielle systolique a été remarquée chez les femelles suite à une forte dose de BPA (300ppm). Également, une augmentation de la sensibilité à l'effet cardiotoxique des agonistes β -adrénergiques uniquement chez les femelles a été observée. Toutefois, les mâles seulement ont démontré une diminution de leur fréquence cardiaque, de leur pression systolique ainsi qu'une augmentation de l'activité du parasymphatique (Belcher et al., 2015).

Au niveau vasculaire, une étude sur des rats spontanément hypertendus a comparé deux groupes de femelles et un groupe de mâles. Une ovariectomie a été effectuée sur un des groupes femelle tandis que l'autre a subi la chirurgie sans se faire retirer les ovaires. Afin de ne pas affecter les données recueillies par changement de protocole, la même chirurgie a été faite pour les mâles sans retirer d'organe pour ensuite observer la différence de protection vasculaire dans les anneaux aortiques de mâles et de femelles (Giachini et al., 2012). Les données recueillies chez les mâles hypertendus ont démontré une augmentation de la

contraction vasculaire durant l'induction de Ca^{2+} ainsi qu'une augmentation de l'expression de STIM et Orai-1 (molécules d'interaction stromale). Cette observation a également été faite chez les femelles hypertendues ayant subi une ovariectomie, mais pas chez celles qui ont conservé leurs ovaires. Ces résultats suggèrent que les hormones sexuelles féminines peuvent inhiber la voie de STIM et Orai-1, contribuant ainsi à une protection vasculaire chez les rates (Giachini et al., 2012).

1.5 Le cœur

Tel que démontré précédemment, le cœur semble une cible lors de complications suite à une restriction de croissance intrautérine. Dans la prochaine section, nous décrirons l'anatomie, le fonctionnement et les mécanismes intracellulaires du cœur.

1.5.1 Développement et anatomie

Le cœur est le premier organe à se développer aussi bien chez l'humain que chez le rat. Dès la troisième semaine, l'embryon humain a besoin du cœur pour perfuser les tissus. Le cœur commence donc à battre avant même qu'il ait atteint sa forme définitive. À environ 35 jours, le cœur est complètement formé (Figure 2). Chez le rat, au 11^e jour du développement fœtal, le cœur bat. Dès le 12^e jour, le sang circule dans l'aorte et le cœur est encore replié sur lui-même et au 14^e jour, le foramen ovalé s'ouvre et le sang peut circuler dans le cœur gauche (Figure 2 : 4^e image).

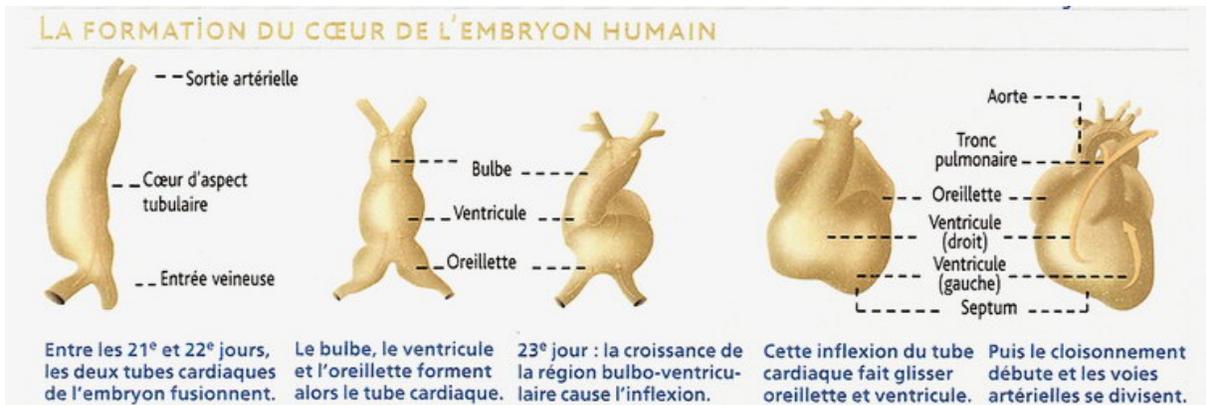


Figure 2 : Développement du cœur humain (J.-B.G., 2004).

1.5.2 Hypertrophie cardiaque

La figure 3 montre en détails à quoi ressemble un cœur humain à l'âge adulte. Le cœur de rat est formé de la même façon. La longueur normale d'une cellule cardiaque chez l'homme est de 120 μm et son diamètre varie de 20 à 30 μm . Ces dimensions sont largement augmentées lors d'une hypertrophie qu'on observera par l'épaississement du myocarde. Le ventricule gauche possède des parois normalement plus épaisses que le droit. Nous étudions plus particulièrement le ventricule gauche, car il s'agit de l'unité contractile par excellence. La présence de nombreux cardiomyocytes permet au ventricule gauche d'effectuer une très grande contraction pour éjecter le sang dans le tout le corps tandis que le ventricule droit n'alimente que les poumons par sa contraction.

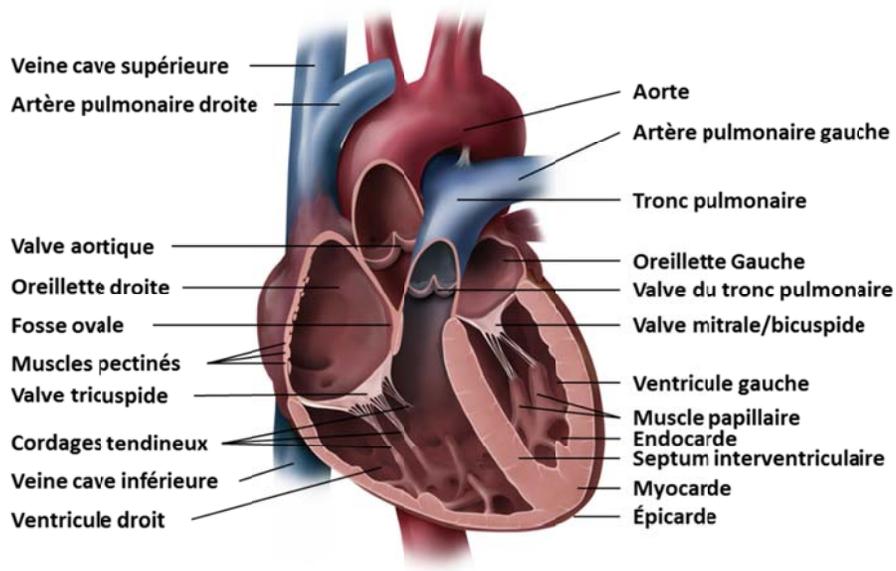


Figure 3 : Coupe frontale (coronaire) du cœur humain adulte. Adapté de (Cardiology, 2013).

Lors d'un remodelage cardiaque tel que développé dans notre modèle, la profondeur des cardiomyocytes ainsi que leur volume total s'en trouvent fortement augmentés (Tableau 1). De plus, la contraction des cardiomyocytes en réponse à un courant de 0,5Hz a également été mesurée en calculant la différence de longueur entre la cellule à l'état basal et à l'état stimulé. Une diminution de 29% de la contractilité a donc été démontrée dans les cardiomyocytes de rats adultes nés RCIU (Tableau 1) (Battista et al. 2005).

	Cellules	Témoins	RCIU
	Longueur (µm)	121.7 ± 3.4 (22)	125.7 ± 2.9 (36)
	Largeur (µm)	30.3 ± 1.7 (22)	30.1 ± 1.0 (36)
→	Profondeur (µm)	16.2 ± 0.5 (22)	19.4 ± 0.7** (36)
→	Volume (pl)	45.7 ± 2.6 (22)	56.0 ± 2.9** (36)
	Coupe transversale (µm)	380 ± 23 (22)	442 ± 19* (36)
	Longueur sarcomérique (µm)	1.75 ± 0.01 (22)	1.78 ± 0.01* (36)
	Nombre de sarcomères	75.5 ± 2.3 (22)	74.1 ± 1.8 (36)
→	Changement dans la longueur de la cellule (%)	6.2 ± 0.5 (15)	4.4 ± 0.4** (32)

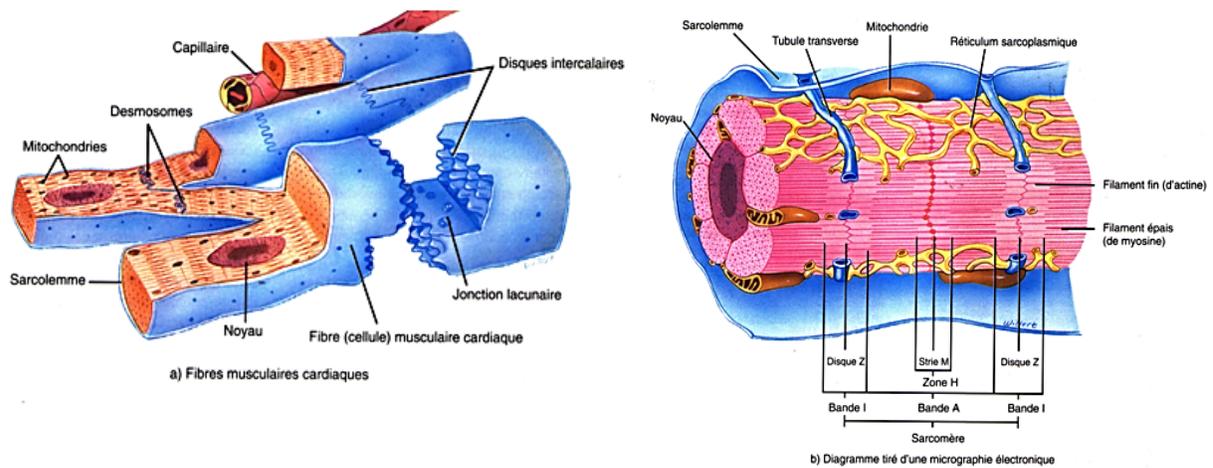
Tableau 1 : Analyse morphométrique et mesure de la contractilité des cardiomyocytes de femelles adultes témoins et RCIU. *P < 0.05, **P < 0.01 versus témoins; nombre de cellules analysées entre parenthèses. (Adapté de Battista et al. 2005)

1.5.3 Muscle cardiaque versus muscle squelettique

Le muscle cardiaque est très semblable au muscle squelettique, mais il comporte tout de même plusieurs différences. Comme points communs importants, ils possèdent tous deux le même mécanisme de potentiel de membrane et leur processus de contraction est le même, soit par le glissement des myofilaments. Ils possèdent également tous deux la présence de myofibrilles composées de sarcomères, mais leur épaisseur est irrégulière dans le muscle cardiaque, car elles doivent se ramifier entre les nombreuses mitochondries. La morphologie des cellules est très différente dans les deux tissus. Les cellules musculaires squelettiques sont définies comme étant longues, cylindriques, multi-nucléées et striées. Le muscle cardiaque contient des cellules courtes, épaisses, ramifiées, généralement mononucléées et également

striées mais qui sont toutefois beaucoup moins bien définies que dans le muscle squelettique (Marieb and Hoehn, 2010). Contrairement aux cellules des muscles squelettiques, elles communiquent entre elles par des disques intercalaires contenant des desmosomes et des jonctions ouvertes et possèdent une très grande quantité de mitochondries (Figure 4).

Figure 4 : Anatomie et histologie du tissu musculaire cardiaque (Tortora and Grabowski, 1993).



1.5.4 Contraction

Comme les cellules cardiaques communiquent entre elles par les jonctions ouvertes, elles forment entre elles une seule entité contractile par le biais d'un couplage électrique qui permet à l'organe tout entier de se contracter en un seul bloc. On appelle automatisme cardiaque, le fait que les cellules soit auto-excitables donc produisent la dépolarisation par elles-mêmes et transmettent le signal, ici par les jonctions ouvertes et le passage d'ions, au reste du cœur et ce, de manière spontanée et rythmique (Marieb and Hoehn, 2010). Les cellules

du muscle squelettique, quant à elles, sont indépendantes l'une de l'autre. La production du potentiel d'action se fait de la même façon dans les cellules du muscle cardiaque que dans les cellules du muscle squelettique. Les canaux rapides à Na^+ voltage-dépendant s'ouvrent dans le sarcolemme suite à la dépolarisation de la membrane. Le potentiel membranaire est alors inversé et passe de -90mV à -30mV . Les canaux sodiques s'inactivent rapidement, mais la dépolarisation favorise l'entrée du calcium via les canaux calciques de type-L et donc permet au réticulum sarcoplasmique (RS) d'ouvrir les canaux lents et de libérer le Ca^{2+} dans le sarcoplasme. Cela émet un signal de liaison à la troponine qui permet l'activation des têtes de myosine et le glissement des filaments d'actine (Figure 5). Afin de ramener le potentiel de membrane à son état initial, les ions potassiques (K^+) font leur entrée par la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATPase}$. La contraction dure plus de 200 ms dans le muscle cardiaque, ce qui est plus long que dans le muscle squelettique. Étonnamment, la période d'inexcitabilité est légèrement plus longue, soit 250ms afin de prévenir un état de contraction tétanique.

COUPLAGE EXCITATION ET CONTRACTION DU MUSCLE CARDIAQUE

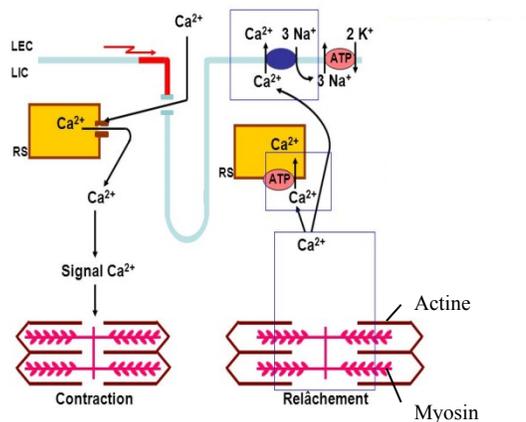


Figure 5 : Couplage excitation-contraction et relâchement du muscle cardiaque. (Silverthorn, 2007)

1.5.5 Mitochondries

Le muscle cardiaque contient une très grande quantité de grosses mitochondries qui occupent 25 à 35% du volume de la cellule contre seulement 2% dans cellules squelettiques. Cette propriété confère une grande résistance à la fatigue aux cellules cardiaques, puisque les mitochondries procurent à la cellule une très grande quantité d'énergie. C'est la présence d'autant de mitochondries qui fait varier le diamètre des myofibrilles, car elles se ramifient entre les nombreuses mitochondries qui les séparent. Les mitochondries étant considérées comme le siège de la production d'énergie de la cellule, les cellules musculaires cardiaques en possèdent beaucoup plus qu'un tissu peu actif comme les cellules adipeuses (Silverthorn, 2007).

1.5.5.1 Morphologie

Les mitochondries comportent deux membranes soit la membrane interne et la membrane externe. Elles ont la même structure générale, mais la membrane interne se replie vers l'intérieur pour former des crêtes (Figure 6). Cette dernière possède également la plus grande proportion de protéines parmi toutes les membranes cellulaires. La membrane externe pour sa part, est très perméable et lisse. Elle confère la forme de l'organite, mais ne possède aucun critère particulier. C'est l'espace inter-membranaire qui les sépare.

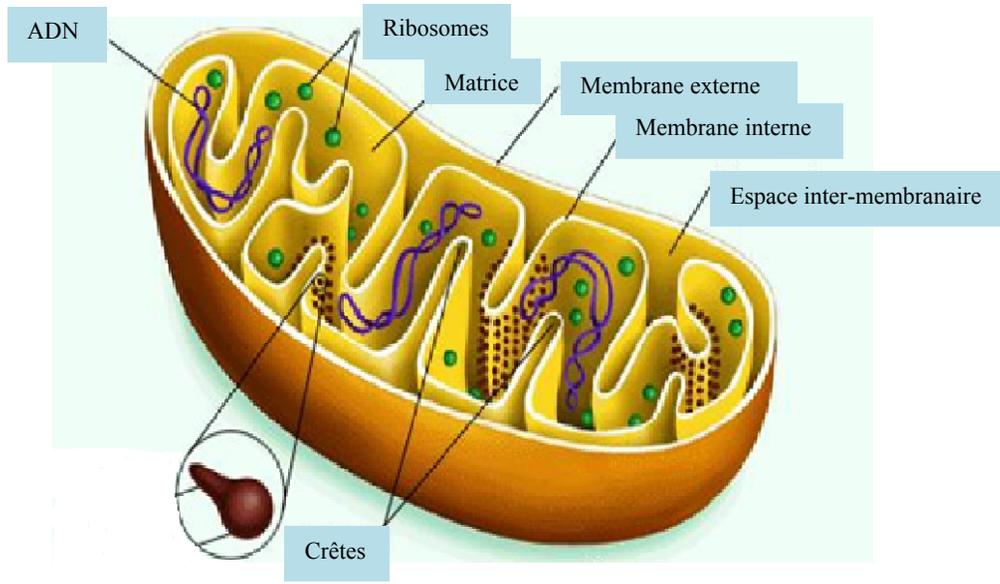


Figure 6 : Mitochondrie. Représentation schématique de la coupe longitudinale d'une mitochondrie. Adapté de Encyclopaedia Britannica 1998

L'intérieur de la mitochondrie, la matrice, contient des enzymes, des granules et de l'acide désoxyribonucléique (ADN). La présence d'ADN mitochondrial leur permet de se diviser sans même que la cellule elle-même ne se divise, puisque la mitochondrie peut synthétiser une partie de ses protéines grâce à son ADN. La division se fait par bourgeonnement et une mitochondrie mère forme deux mitochondries filles. Les mitochondries peuvent également favoriser le développement de nouvelles crêtes lorsque les besoins en adénosine triphosphate (ATP) de la cellule sont trop importants (Marieb and Hoehn, 2010).

1.5.5.2 Fonction dans la signalisation calcique

Les mitochondries sont essentielles au bon fonctionnement de la cellule. Elles sont responsables de la synthèse d'ATP et fournissent toute l'énergie nécessaire aux activités cellulaires (Silverthorn, 2007). La production de l'ATP par la mitochondrie peut se faire par le biais du cycle de Krebs, par la chaîne de transport des électrons et également par la signalisation calcique. L'entrée de calcium (Ca^{2+}) dans la mitochondrie permet de réguler les fonctions intrinsèques de l'organite comme la production d'ATP. Cela se fait par la phosphorylation oxydative, car l'augmentation de Ca^{2+} permet d'augmenter la présence de nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase (NADH) et donc de faciliter la libération des électrons de la chaîne respiratoire (Rizzuto et al., 2012, Patergnani et al., 2011). À son tour, la mitochondrie peut influencer la signalisation calcique en modifiant les concentrations d'ATP, de NADH, de pyruvate et des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Walsh et al., 2009). La présence de nombreuses mitochondries à certains endroits peut s'avérer très stratégique, par exemple, autour du noyau, de la membrane plasmique et à la limite des granules sécrétrices ce qui permet une gestion spécifique de la signalisation calcique dans le cytoplasme (Walsh et al., 2009).

Pour entrer dans la mitochondrie, le Ca^{2+} doit passer à travers les deux membranes, soit la membrane mitochondriale externe (OMM) et la membrane mitochondriale interne (IMM). C'est la présence du canal anionique voltage-dépendant en abondance qui confèrera la perméabilité de la membrane externe au Ca^{2+} (Rizzuto et al., 2012). Cela permet une entrée à la fois rapide et à la fois limitée du Ca^{2+} . Pour passer la membrane interne, le calcium doit

passer par l'uniport de calcium mitochondrial (MCU) ayant une faible affinité pour le Ca^{2+} (Rizzuto et al., 2012, Walsh et al., 2009, Patergnani et al., 2011). Le MCU possède un effet biphasique qui lui permet également de s'inactiver au-delà d'un certain niveau de Ca^{2+} (Patergnani et al., 2011). Une fois entré, ce sont les canaux échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX) qui transportent le calcium vers le cytosol (Rizzuto et al., 2012). Toutefois, le calcium peut également sortir de la mitochondrie par le pore de transition perméable (PTP). Sa présence est très importante pour éviter une augmentation prolongée de Ca^{2+} qui mènerait à l'apoptose (Patergnani et al., 2011).

1.5.5.3 Le processus de fission/fusion

Lorsque la cellule démontre des besoins plus élevés en ATP, les mitochondries ont la capacité de se diviser afin d'augmenter la production d'ATP. Ce processus dynamique est appelé la fission/fusion. Celui-ci provoque des changements fréquents dans la morphologie des mitochondries afin de conserver le nombre de mitochondrie dans une cellule, de régler un défaut dans l'ADN ou dans les protéines, mais aussi afin d'augmenter la respiration mitochondriale induite par le glucose et la surproduction des ROS (Yu et al., 2006, Okamoto and Shaw, 2005). Plusieurs composants de base impliqués dans la fission/fusion ont été découverts. Certains sont impliqués dans la fission : Guanosine triphosphatase (GTPase), Protéine apparentée aux dynamines 1 (Drp1) et Fission 1 (Fis1) et d'autres dans la fusion : Mitofusine et Protéine d'atrophie optique 1 (Opa1) (Yang et al., 2008). Il s'agit d'un processus complexe, puisqu'il faut que les deux membranes mitochondriales effectuent la

fission et la fusion tout en conservant leur propriété. Si un défaut se crée durant le processus, cela peut être létal pour la cellule ou peut entraîner des maladies telle que l'atrophie optique (Yang et al., 2008, Okamoto and Shaw, 2005).

1.6 Voies métaboliques

Les différentes voies métaboliques, détaillées ci-dessous, se terminent toutes dans la mitochondrie afin de permettre une production optimale d'ATP. Le glucose et le glycérol sont glycolysés dans le cytosol et fournissent un substrat à la mitochondrie pour la production d'ATP. Les acides aminés font leur entrée dans la mitochondrie par le biais des différentes voies métaboliques sans être spécifiques à une seule et les acides gras entrent au niveau de l'acétyl-CoA par l'intermédiaire de la β -oxydation. Les protéines, les acides gras et les glucides sont les substrats principaux qui favorisent les étapes du développement tout au long de la vie. Plus particulièrement chez le fœtus, la glycolyse est prioritaire et son importance augmente au cours de la croissance pour diminuer suite à l'accouchement. L'accumulation des protéines, quant à elle, survient dès le début du développement et persiste environ jusqu'au 11^e mois suivant la naissance. Une fois le maximum de protéines atteint, ce sont les acides gras qui prennent le relais à un mois du terme. Il se produit donc un transfert de la voie du glucose vers la voie des acides gras. Puisque le fœtus est nourrit par transfert placentaire, l'altération d'une des voies métaboliques pourrait entraîner une RCIU (Lopaschuk and Jaswal, 2010). Les bébés RCIU peuvent naître légèrement plus tôt et les voies métaboliques doivent

s'y adapter. Hypothétiquement, le transfert de la voie du glucose vers la voie des acides gras pourrait se faire plus tôt et ainsi affecter le développement.

Les acides aminés essentiels, les acides gras, les vitamines et les éléments minéraux doivent tous être facilement accessibles au fœtus afin d'assurer sa croissance. La moitié des besoins du fœtus sont comblés par les acides aminés (protéines) et le lactate (dérivé du glucose) tandis que l'autre moitié est comblée par le glucose (hydrates de carbones). La figure 7 schématise les substrats énergétiques utilisés par le fœtus au cours de son développement chez l'humain.

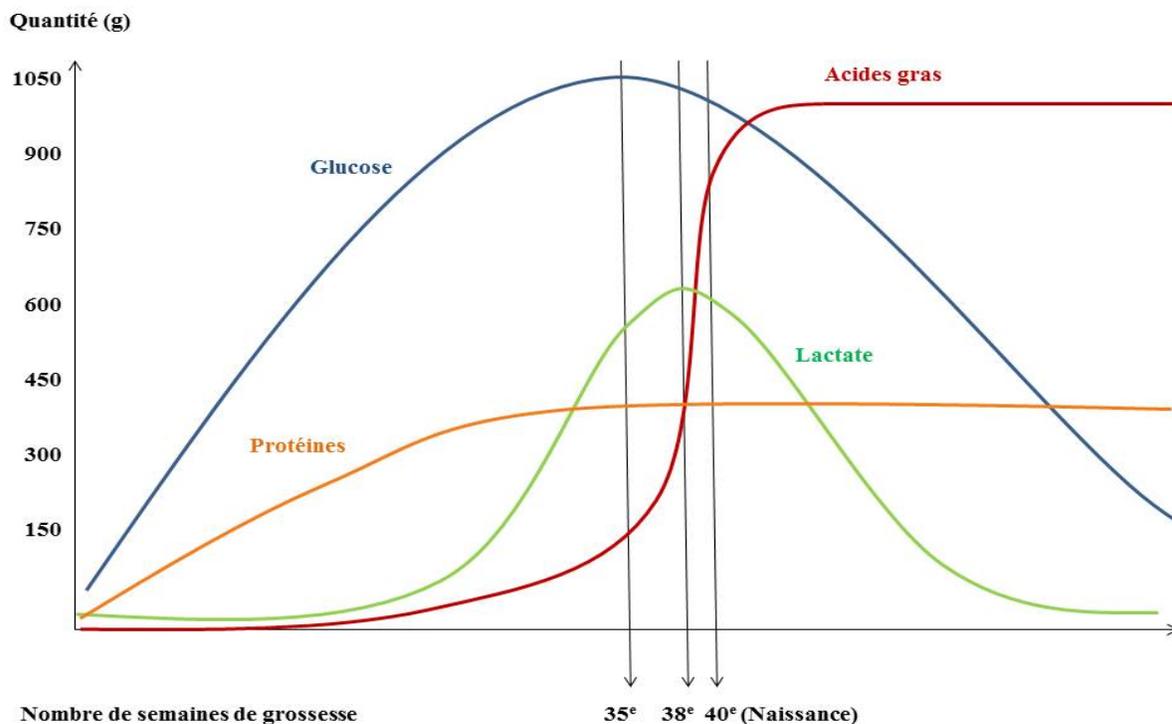
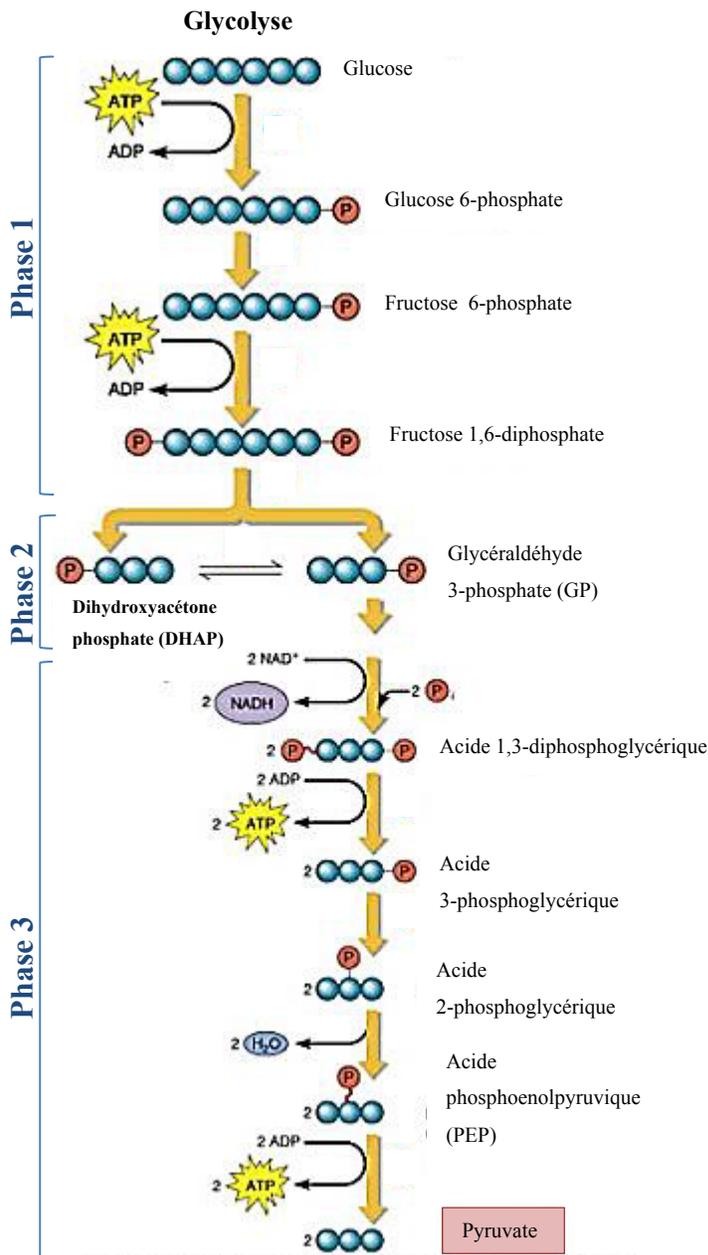


Figure 7 : Utilisation des substrats énergétiques lors du développement fœtal chez l'humain. Les données après la naissance sont approximatives. Figure conçue par l'étudiant.

1.6.1 Métabolisme du glucose

Les hydrates de carbones constituent la source première de l'alimentation chez le fœtus. La glycolyse consiste à réduire le glucose de six carbones en deux molécules de trois carbones, soit le pyruvate. Elle générera deux ATP et deux NADH (Figure 8). Le pyruvate



constituera le point tournant entre la voie anaérobie et la voie aérobie. Cette dernière se poursuivra dans la mitochondrie.

Figure 8 : Glycolyse. Détails de la voie métabolique du glucose. (Adapté de Silverthorn, 2007)

Phase 1 : Activation du glucose via la phosphorylation

Phase 2 : Scission du glucide

Phase 3 : Oxydation du glucide et formation d'ATP.

1.6.2 La β -oxydation des acides gras

Les lipides, constituant la réserve énergétique par excellence du corps, sont requis de façon plus importante durant le dernier tiers de la grossesse. Il s'agit des acides gras essentiels et des longues molécules d'acide gras polyinsaturés (LCPU-FAs) (Johnson and Everitt, 2002). Certains lipides, étant de grosses molécules, doivent d'abord être dégradés avant de pouvoir produire de l'énergie. Leur dégradation produit des acides gras et du glycérol. Le premier subit la β -oxydation dans la mitochondrie qui conduit à la production d'acétyl-CoA dans la mitochondrie. Quant au glycérol, il sera converti en glycéraldéhyde phosphate, un intermédiaire dans la glycolyse, ce qui entraînera la formation de pyruvate. Les triglycérides peuvent également être oxydés pour produire de l'énergie. L'entrée des lipides dans la mitochondrie se fait par transport actif et est plus complexe que l'entrée de glucose ou de protéines.

Les acétyl-CoA subissent la bêta-oxydation en étant transportés du cytosol à la matrice mitochondriale. Plus précisément, les acides gras à longue chaîne (LCFA) sont d'abord réduits en acides gras (FA) par les peroxysomes. Ensuite, la conversion des acides gras en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase permet leur transport vers la carnitine palmitoyltransférase 1 – alpha (CPT1 α). Récemment, il a été démontré que l'acyl-CoA synthétase à longue chaîne (ACSL) et le canal à anion voltage dépendant (VDAC) forment un complexe avec CPT1 et permettrait ce transport (Lee et al., 2011). En passant la membrane mitochondriale, l'acyl-CoA est combiné à la carnitine pour donner l'acyl-carnitine. La carnitine se sépare ensuite de l'acyl et c'est l'ATP qui favorisera sa liaison avec la coenzyme A, il en résulte alors l'acyl-CoA.

Ensuite, une double oxydation entraîne la réduction d'un nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) en nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase ($\text{NADH}+\text{H}^+$) et d'une flavine adénine dinucléotide (FAD) en flavine adénine dinucléotide hydroquinone (FADH_2). Pour terminer, un enzyme de clivage réduit les acides gras en unité à deux carbones afin d'obtenir l'acétyl-CoA et enfin entrer dans le cycle de l'acide citrique (Marieb and Hoehn, 2010, Silverthorn, 2007).

1.6.3 Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, aussi connu sous le nom de cycle de l'acide citrique, a lieu dans la matrice mitochondriale. Le pyruvate formé par la glycolyse utilisera la voie de dégradation aérobie pour former l'acétyl-CoA à l'aide de la coenzyme A. Cette réaction produira un NADH. C'est ensuite l'acétyl-CoA qui marquera le début du cycle de Krebs. Il peut provenir autant de la voie du glucose que de celle des acides gras. Il s'agit d'un cycle sans fin qui produit à chaque tour un ATP, trois NADH et un FADH_2 .

1.6.3.1 Carnitine palmitoyltransférase 1-alpha (CPT1 α)

La carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) existe sous trois isoformes soit CPT1 α (CPT1-L), CPT1 β (CPT1-M) et CPT1c. Ce dernier est l'isoforme principalement retrouvé au niveau du cerveau. CPT1 α se retrouve dans tous les tissus à l'exception des muscles

squelettiques et des tissus adipeux. CPT1 β est majoritairement présent dans le cœur, les muscles squelettiques et les tissus adipeux. Cependant, il a été démontré que CPT1 α est plus exprimé dans les cœurs fœtaux et que son expression diminue au profit de CPT1 β en fonction de l'âge (Brown, 1996).

Le CPT1 α transporte les acyl-CoA dérivés des acides gras libres à l'intérieur de la mitochondrie afin qu'ils puissent être oxydés et produire de l'énergie. Le couplage de l'Acyl-CoA avec la carnitine, essentielle au transport à travers la membrane mitochondriale, crée de l'Acyl-carnitine pour être transloquée par la carnitine acyl-carnitine translocase (CACT). Elle est ensuite estérifiée avec la CoA par la carnitine palmitoyltransférase II (CPT2) de la membrane mitochondriale interne. (Figure 9). La carnitine se retrouvera libre à nouveau et sera rejeté à l'extérieur de la mitochondrie, dans le cytosol, par CACT pour commencer un autre cycle. L'Acyl-carnitine devenue Acyl-CoA pourra subir une β -oxydation et entrer dans le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons pour former une grande quantité d'ATP et ainsi favoriser les activités de la cellule dont la contraction du cardiomyocyte (Figure 9).

CPT1 contiendrait un domaine N-terminal additionnel d'environ 160 acides aminés qui le différencierait de CPT2. Cette région spécifique de CPT1 permettrait l'inhibition par le malonyl-CoA qui est synthétisé à partir de l'acétyl-coA par l'acyl-CoA carboxylase (ACC) (Woldegiorgis et al., 2005). Le malonyl-CoA lui-même est inhibé par la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) (Figure 9). Il a été démontré que la sensibilité du transporteur face à l'inhibition du malonyl-CoA serait augmentée par l'insuline, mais diminuée dans le diabète (Park et al., 1995). L'insuline joue donc aussi un rôle important sur CPT1 α , car elle inhibe la transcription du gène. Toutefois, c'est l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), les

acides gras et les proliférateurs peroxysomaux médiés par leur récepteur (PPAR) qui viendront stimuler la transcription de ce gène (Chatelain et al., 1996, Keller et al., 1993). Également, après la naissance, la concentration hépatique du malonyl-CoA diminuerait graduellement d'heure en heure pour favoriser l'utilisation des acides gras. Ainsi CPT1 α serait de moins en moins altéré avec l'âge (Prip-Buus et al., 1990).

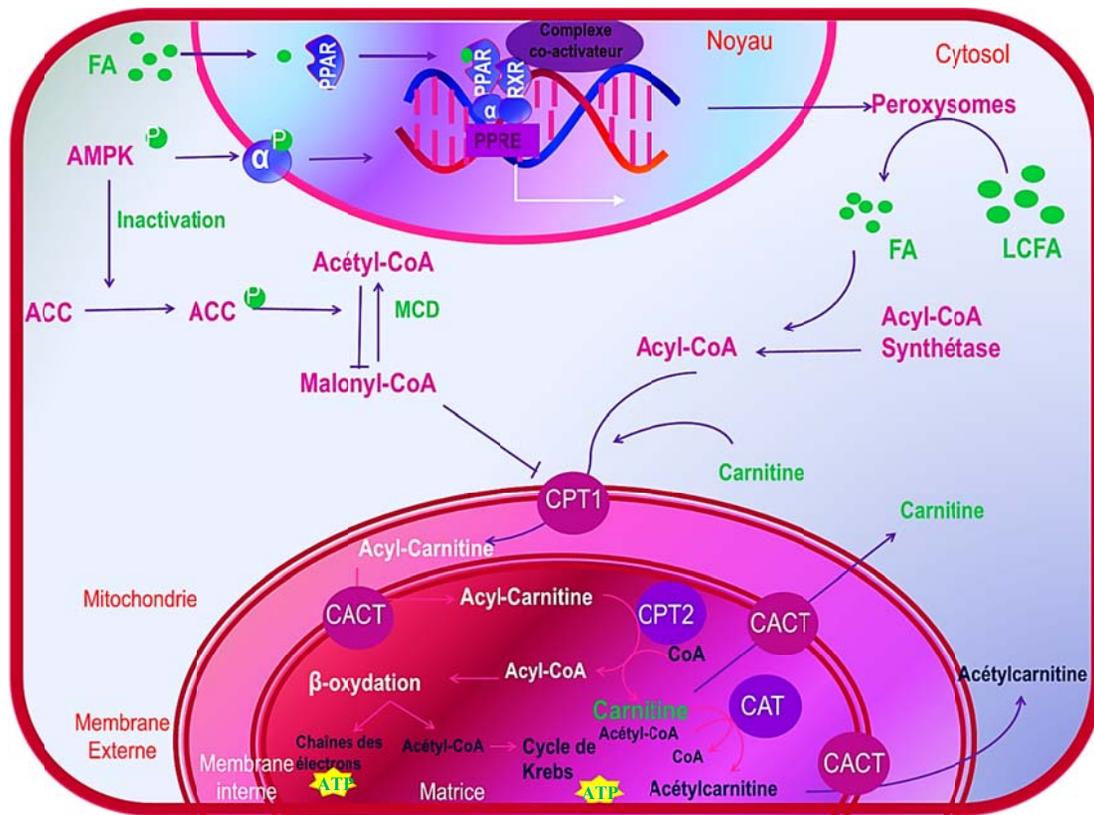


Figure 9 : Schéma représentant le métabolisme des acides gras autour du transporteur de la carnitine, la carnitine palmitoyltransférase 1 – alpha (CPT1 α). AMPK: Protéine kinase activé par l'adénosine monophosphate, CACT: Carnitine acylcarnitine translocase, CPT: Carnitine palmitoyl transférase, CAT: Chloramphénicol acétyl transférase, ACS: Acyl CoA synthétase, ACC: Acyl CoA décarboxylase, MCD: Malonyl CoA décarboxylase, ATP: Adénosine triphosphate, CoA: CoEnzyme A, PPAR: Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes, PPRE: Élément de réponse aux proliférateurs de peroxysomes, LCFA: Acides gras à longue chaîne, FA: Acides gras. Figure conçue par l'étudiant.

1.6.3.2 Acyl-CoenzymeA synthétase à longue chaîne 1 (ACSL1)

L'Acyl-CoA synthétase à longue chaîne (ACSL) est connu pour son action dans le métabolisme des acides gras. Toutefois, son rôle exact est encore mal compris (Li et al., 2009, Ellis et al., 2011, Li et al., 2006, J. Durgan et al., 2006). Il existe six isoformes d'ACSL. De tous les isoformes, ACSL1 le plus abondant, mais il ne serait pas uniquement présent dans la mitochondrie. Une récente étude a démontré qu'ACSL1 serait lié avec CPT1 α (Lee et al., 2011). De plus, ils formeraient un complexe avec VDAC1 comportant trois CPT et trois ACSL pour un VDAC (Figure 10). Dans l'étude, une immuno-précipitation (IP) de CPT1 α suivi d'un immunobuvardage de type Western de CPT1 α , ACSL et VDAC1 a révélé la présence de ces trois protéines. La même expérience a été faite en effectuant au préalable une IP soit d'ACSL soit de VDAC1 dévoilant les mêmes résultats suggérant la présence d'un complexe.

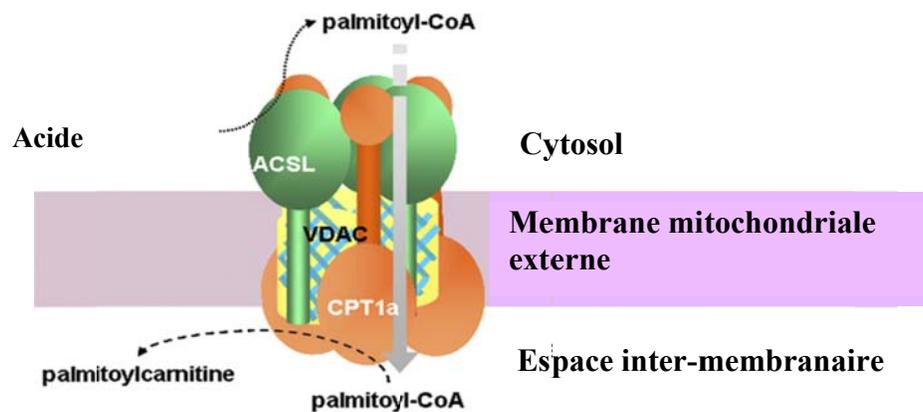


Figure 10 : Modèle proposé du complexe hétéro-oligomérique de la membrane externe mitochondriale. Il contient CPT1 α , ACSL1, VDAC1. Adapté de (Lee et al., 2011)

1.6.3.3 Canal à anion voltage-dépendant (VDAC1)

Le canal à anion voltage-dépendant existe sous trois isoformes, VDAC1, VDAC2, VDAC3, présents dans la plupart des tissus en quantités différentes (Lee et al., 2011, Martel et al., 2014). VDAC1 est l'isoforme le plus abondant dans le cœur et dans les mitochondries en général (Lee et al., 2011, Yamamoto et al., 2006). Il se situe sur la membrane externe de la mitochondrie et est la plus abondante des protéines de cette membrane. Comme introduit précédemment, il ferait partie du complexe concernant CPT1 α , ACSL et VDAC1. Il agit comme une porine qui laisse passer les métabolites, les ions et l'eau dans la mitochondrie. Il pourrait également avoir un impact sur la perméabilité de la membrane et jouerait un rôle dans la détection des lipides (Martel et al., 2014). Plusieurs études ont révélé que VDAC serait impliqué dans l'apoptose cellulaire une fois phosphorylé (Weisthal et al., 2014, Martel et al., 2014, Kerner et al., 2012, Shoshan-Barmatz et al., 2006). Cette phosphorylation pourrait affecter le cytochrome c (Weisthal et al., 2014), le transport de l'ADP (Lee et al., 2011) et les niveaux de calcium cytosolique (Weisthal et al., 2014).

1.6.4 Chaîne de transport des électrons

Elle constitue la dernière étape de la production d'ATP. Elle a lieu grâce aux électrons libérés durant le cycle de Krebs où le NADH et le FADH₂ servent de transporteurs pour ceux à haute énergie issus de la glycolyse. La chaîne de transport comporte quatre sous-unités en chaînes qui reçoivent les protons et les transportent de la matrice mitochondriale vers l'espace

inter-membranaire. Par exemple, le complexe I récupérera d'abord les électrons du NADH et transportera quatre protons (Figure 11). Le complexe II quant à lui récupérera les électrons du FADH₂, mais ne transportera aucun proton. Les complexes III et IV feront respectivement passer quatre et deux protons dans l'espace inter-membranaire. Comme il est le dernier de la chaîne de transport, le cytochrome c oxydase s'occupe du gradient de protons afin de permettre la synthèse de l'ATP (Hinkle et al., 1991). Le complexe IV est également appelé cytochrome c oxydase et est étudié pour plusieurs raisons. Par exemple, une déficience de ce complexe peut sévèrement affecter plusieurs parties du corps tels que les muscles squelettiques, le cœur, le cerveau et le foie (GHR, 2012). La mesure de son activité peut nous permettre de valider l'efficacité de la β -oxydation des acides gras. Le dernier accepteur d'électrons sera l'oxygène qui s'occupera de la formation de l'eau (H₂O) en se combinant aux protons et aux électrons qui auront récupéré leur énergie initiale. Les protons qui auront alors traversé la membrane interne de la mitochondrie regagneront ensuite la matrice par la pompe ATP synthétase qui sera à l'origine de la formation d'ATP (Figure 11). Chaque NADH produira donc de 1,5 à 2,5 molécules d'ATP et chaque FADH₂ 1,5 molécules d'ATP pour un total énergétique variant entre 30 à 32 molécules d'ATP en incluant ceux obtenus lors de la glycolyse.

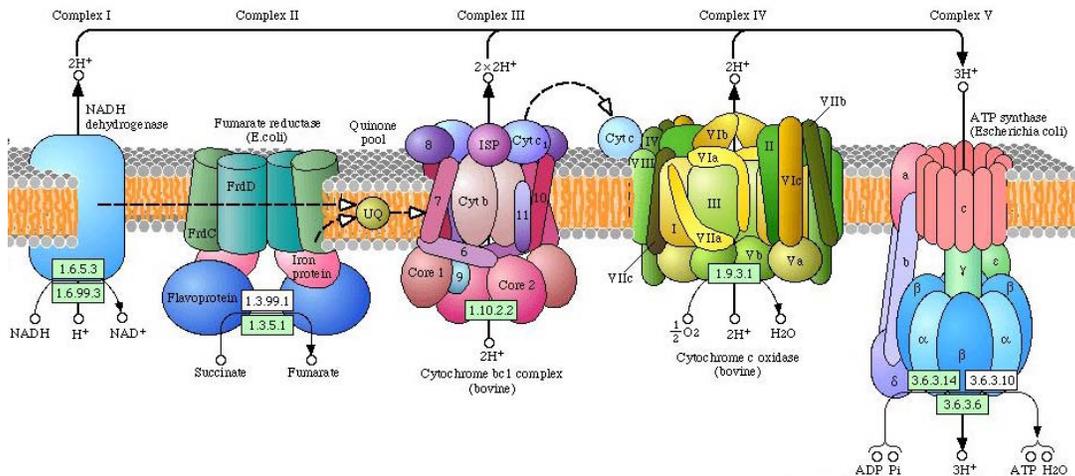


Figure 11 : Chaîne de transport des électrons. H⁺ sont les protons transportés. La matrice mitochondriale se trouve au bas de la figure. Tiré de (KEGG, 2004).

La figure 12 montre un bref aperçu de la relation entre les voies métaboliques mitochondriales ainsi que la production d'ATP en résultant.

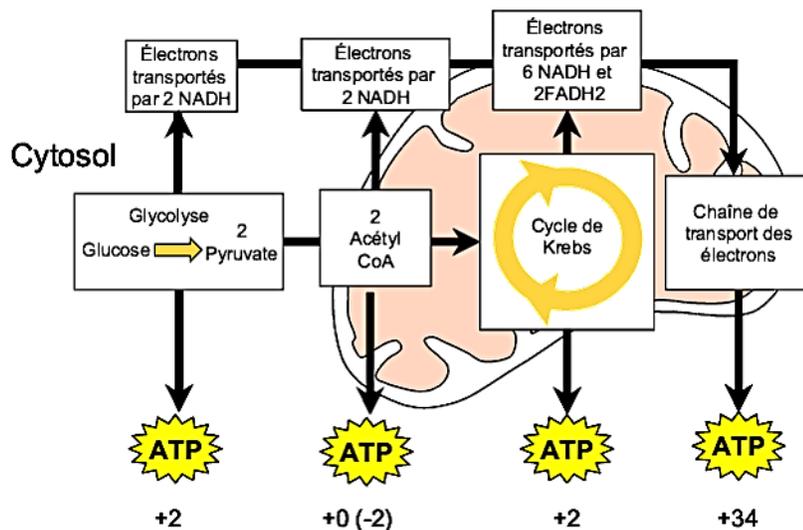


Figure 12 : Ensemble des voies métaboliques à l'intérieur de la mitochondrie. Schéma simplifié démontrant leur interrelation. Quatre grandes étapes de la production d'ATP (Morin, 2003).

1.7 Modèle de RCIU utilisé en laboratoire

Toutes les voies métaboliques peuvent être atteintes lors d'une RCIU. Le modèle utilisé dans le laboratoire consiste à donner une diète faible en sodium pour la dernière des trois semaines de gestation de la rate. Cette diète induit une diminution de l'expansion volumique chez la mère et s'apparente à des RCIU idiopathiques chez l'humain. Il a été démontré qu'une diminution de l'expansion volumique est associée à des bébés RCIU (Salas et al., 1993). La diète est donnée au dernier tiers de la grossesse (14^e jour sur 23 de gestation) pour interférer avec l'augmentation du volume circulant qui survient à cette période. C'est aussi la période où la croissance fœtale est maximale. Cette diète n'entraîne pas de mort *in utero* ni de malformation fœtale. Également, une diminution du diamètre des artères utérines arquées et du poids des placentas sont observés suite à cette diète (Roy-Clavel et al., 1999, Bedard et al., 2005, St-Louis et al., 2006), ce qui suggère une diminution de la perfusion utéroplacentaire. Les fœtus subissent une RCIU. En effet, ce modèle est stable au cours des ans tel que démontré au tableau 2.

Diète	Poids mâle	Poids femelle
Contrôle <small>(Roy-Clavel et al. 1998)</small>	5.21 ± 0.12 g	
RCIU <small>(Roy-Clavel et al. 1998)</small>	4.45 ± 0.22 g **	
Contrôle (2014)	5.86 ± 0.40 g	5.48 ± 0.30 g
RCIU (2014)	4.88 ± 0.57 g ***	4.60 ± 0.50 g **

Tableau 2 : Comparaison des poids des fœtus à terme -1 jour entre 1998 et 2014 des contrôles vs RCIU. **P < 0.01, ***P < 0.001 (Roy-Clavel et al., 1999).

En fonction des études effectuées, certains rats sont sacrifiés au niveau fœtal (terme – 1 jour) tandis que d'autres sont examinés jusqu'à 1, 5, 12 ou même 20 semaines. La puberté étant considérée à cinq semaines chez le rat, la période adulte à douze semaines et la maturité à vingt semaines, les résultats observés ainsi que leurs conséquences sont très différents. À l'âge adulte (12 semaines), on observe chez les rats nés RCIU mâle et femelle une augmentation de l'activité rénine plasmatique. Par contre, une diminution de l'aldostérone plasmatique est observée uniquement chez les femelles (Battista et al., 2002). Les niveaux du peptide natriurétique auriculaire (ANP) et de la myosine de chaîne légère de l'oreillette sont augmentés dans le ventricule cardiaque gauche chez les femelles adultes nées RCIU. Ces augmentations suggèrent une hypertrophie cardiaque (Battista et al., 2005). La pesée des organes fœtaux et à douze semaines a démontré, dans les deux cas, que le ventricule gauche ainsi que le cerveau des femelles RCIU était de poids similaire à celui des animaux contrôles et ce, malgré la taille globale des rates plus petite. Le rein quant à lui se trouvait plus petit dans le groupe expérimental (Battista et al., 2002). L'observation au niveau fœtale suggère qu'un environnement fœtal défavorable entraîne des changements adaptatifs afin de permettre la survie du fœtus en redistribuant le débit sanguin vers les organes vitaux prioritaires tels que le cœur et le cerveau. Le tableau 3 montre les données recueillies sur le cœur.

	Diète et Ratons par portée	Total, g	Ventricules cardiaques, mg	Ventricule gauche, g
Fœtus	Témoins (8) RCIU (8)	5.0±0.2 4.1±0.1‡	27±1 25±1	
Mâle (12 sem)	Témoins (16) RCIU (15)	451±9 383±8‡		1.17±0.04 1.02±0.03†
Femelle (12 sem)	Témoins (16) RCIU (15)	258±6 233±5†		

Tableau 3 : Poids corporel total et poids ventriculaire de fœtus et d'adultes de 12 semaines séparés par sexe et par groupe d'étude. Témoins et RCIU de chaque âge. †P < 0.01, ‡P < 0.001. Adapté de (Battista et al., 2002)

1.8 Le rat comme modèle expérimental

Le rat démontre les mêmes adaptations cardiovasculaires que ceux retrouvés dans la grossesse chez l'humain (Dowell and Kauer, 1997). De plus, son génome se rapproche de celui de l'homme et est similaire dans sa grande variabilité. Finalement, la courte durée du cycle œstral (4 jours) et de la période de gestation (23 jours) est avantageuse. Nous avons choisi d'utiliser le modèle de Sprague-Dawley qui est connu pour avoir un phénotype et un génotype très variable. C'est cette caractéristique qui nous permet de nous rapprocher le plus de l'humain.

1.9 Hypothèse et objectifs

La diminution de la contractilité et l'augmentation du volume des cardiomyocytes observée dans les cœurs de femelles adultes du modèle RCIU sont des conséquences de l'environnement fœtal défavorable. Considérant qu'un évènement s'est produit *in utero*, considérant que le débit cardiaque a été redistribué vers le cœur et considérant qu'en période périnatale l'utilisation des acides gras comme substrat énergétique devient plus importante que celle du glucose au niveau des cardiomyocytes, nous émettons l'hypothèse que le transfert de la voie de l'utilisation du glucose vers l'utilisation des acides gras se fait plus tôt chez les fœtus RCIU. Nos objectifs spécifiques chez le fœtus sont de comparer selon le sexe et la condition fœtale (RCIU vs contrôle) :

- 1- L'expression du CPT1 α et de ses protéines associés.
- 2- L'activité COX et un indicateur du nombre de mitochondries, afin de déterminer si le métabolisme énergétique est augmenté.

Ces travaux permettront de mieux caractériser l'influence de l'environnement fœtal sur le métabolisme énergétique cardiaque.

2. Article

Les travaux de recherche effectués sont présentés ici sous forme d'article intitulé «*Impacts of intrauterine growth restriction and sex on fatty acid metabolism in fetal rat cardiomyocytes*» en vue d'être publié dans *American Journal of Physiology*. Le projet a été élaboré par Cynthia Gravel. La totalité des travaux, figures et tableaux du projet ci-présent ont été effectués par l'étudiante ainsi que la première version de ce manuscrit. Les résultats préalablement obtenus au laboratoire et mentionnés dans cet article proviennent de différents anciens étudiants. Le support technique et d'enseignement a été apporté par Benoit Sicotte. La conception du manuscrit a été réalisée par la directrice de recherche, Michèle Brochu.

2.1 Résumé de l'article en français

Dans le laboratoire, un modèle de restriction de croissance intrautérine (RCIU) a été développé suite à l'attribution d'une diète faible en sodium chez la rate au cours de la dernière semaine de gestation. Précédemment, une hypertrophie des cardiomyocytes ainsi qu'une diminution de leur activité contractile ont été observées chez les femelles RCIU à l'âge adulte. Nous émettons l'hypothèse que les effets de la RCIU observés relèvent d'une augmentation de la β -oxydation des acides gras par rapport aux témoins. L'objectif de cette étude est de mesurer les constituants du métabolisme des acides gras soit le transporteur principal des acides gras, la carnitine palmitoyltransférase-1-alpha (CPT1 α) ainsi que ses protéines associées l'acyl-CoenzymeA synthétase-1 (ACSL1) et le canal anionique voltage-dépendant de type 1 (VDAC1). Nous mesurerons aussi l'activité du cytochrome c oxydase, marqueur de l'activité mitochondriale et le nombre de mitochondries. Les analyses seront faites tenant compte du sexe et de la condition fœtale (restriction de croissance intrautérine vs contrôle). Pour ce faire, les rates sont sacrifiées au 22^e jour de gestation (Terme = 23 jours) et les fœtus sont prélevés et séparés selon le sexe. Des préparations membranaires (totales et mitochondriales) des cœurs fœtaux sont effectuées. Les résultats d'immuno-buvardages de type Western ont démontré que CPT1 α et ACSL1 sont significativement augmentés chez les femelles du groupe expérimental RCIU. L'expression génique de CPT1 α et l'expression protéique de VDAC1 sont similaires dans tous les groupes. Le nombre de mitochondries ainsi que leur activité ne sont pas différents entre les groupes. Ces résultats suggèrent que la RCIU entraîne des modifications au niveau du métabolisme des acides gras et ce, de manière spécifique au sexe.

MOTS-CLÉS

Diète faible en sodium, mitochondries, β -oxydation, cœur, grossesse

2.2 Manuscrit

Impacts of intrauterine growth restriction and sex on fatty acid metabolism in fetal rat cardiomyocytes

Cynthia Gravel, Benoit Sicotte and Michèle Brochu

Department of molecular and integrative Physiology, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: IUGR and fatty acid metabolism in cardiomyocytes

Corresponding author:

Dr. Michèle Brochu

Département de physiologie moléculaire et intégrative

Université de Montréal

C.P. 6128 Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Téléphone: 514-343-6347

Fax: 514-343-2111

ABSTRACT

In the laboratory, an intrauterine growth restriction (IUGR) model was developed by giving a low-sodium diet to pregnant rats at the last gestation's trimester. Previously, cardiomyocyte hypertrophy and contractility decrease in IUGR female adult offspring have been observed. We hypothesized that the effects of IUGR observed are caused by an increase in β -oxidation of fatty acids relative to controls. The objective of this study is to measure the components of the fatty acid metabolism starting with the main carrier of fatty acids, alpha-1-palmitoyl carnitine (CPT1 α) and its associated proteins acyl-coenzymeA synthase-1 (ACSL1) and voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1). We will also measure cytochrome c oxidase activity, the mitochondrial activity marker and the number of mitochondria. Analyses will be made considering sex and fetal condition (intrauterine growth restriction vs control). To do this, the rats were sacrificed by decapitation at day 22 of gestation (term = 23 days) and fetuses were removed and separated by sex. Preparations of cell lysates (total and mitochondrial) from fetal hearts were performed. By performing Western blots, CPT1 α and ACSL1 were significantly increased in female in the IUGR experimental group. Gene expression of CPT1 α and protein expression of VDAC1 are similar in all groups. The number of mitochondria and their activities are not different between groups. These results suggest IUGR model causes changes in the fatty acid metabolism in a sex-specific manner.

KEYWORDS

Low-sodium diet, mitochondria, β -oxidation, heart, pregnancy

INTRODUCTION

The intra-uterine growth restriction (IUGR) affects 5 to 8% of births in Canada. It is now well-established that adverse fetal environment is associated with cardiovascular diseases in adulthood (1, 2). Indeed, a nutritional restriction in rats during gestation that conducts to an IUGR reveals an elevation in arterial blood pressure in male increasing with age from 60 days and female from 100 days (3, 4). Moreover, in an IUGR rat model induced by protein malnutrition, diastolic blood pressure was increased compared to controls at adult ages. Using isolated heart experiments, the authors have also observed more episodes of ventricular tachycardia and reduction in coronary blood flow in the IUGR group. (5). However, the mechanisms occurring in the fetus heart that induce long-term consequences remain to be elucidated (2).

Cardiomyocytes development in fetal life is more dependent on glycolysis for energy production (adenosine triphosphate (ATP) production). However, at late fetal stage, there is a switch in the energy production pathway from glycolysis to mitochondrial oxidative metabolism (6, 7). Indeed, the energy provided by glycolytic pathway is rapidly available and used for cell proliferation but is less efficient than the mitochondria pathway. Then, the switch occurs when the cardiomyocytes are at a differentiated state and have high-energy demand (7). In heart of fetal/newborn rabbits, it was shown that almost half of the ATP production is provided by glycolysis and less than 15% by fatty acids β -oxidation. At 7 days old, this was reversed and fatty acids β -oxidation is principally used throughout life (7). However, in pathological condition such as cardiac hypertrophy, the energy requested by the proliferating cells must be rapidly available thus; glycolysis became the principal pathway (7). In regard to

fetal programming of cardiovascular disease, it could be suggested that the mechanism controlling the used pathway is unsettled.

Fatty acids β -oxidation is the main fuel for mitochondrial ATP generation by the adult heart. However, in pathological conditions, such as cardiac hypertrophy, in the early stage there is a mitochondrial biogenesis and an increase in glycolysis (8, 9).

It has been recently demonstrated that the carnitine palmitoyltransferase 1-alpha (CPT1 α) expression induces a metabolic remodeling to hypertrophic signal (10). Two isoforms of CPT1 are known, CPT1 α is predominant in the fetus when CPT1 β is the most present in adult. CPT1 α is a carnitine transporter located on the outside mitochondrial membrane and is known as an excellent marker of fatty acids pathway (11, 12). CPT1 α is active in a complex with long chain Acyl-CoA synthetase (ACSL) and voltage-dependent anion channel (VDAC) to carry carnitine into mitochondria (13). There are six isoforms of ACSL and three of VDAC. ACSL1 and VDAC1 are known to be the most abundant isoforms in heart (10, 14-16).

To better understand the link between adverse fetal conditions and adult disease, we developed an animal model of intrauterine growth restriction. By administering a low-sodium diet to pregnant rats during the last week of gestation, reduced maternal circulatory volume, decreased uterine artery diameter and placental weight were observed and associated with delivery of intrauterine growth restricted (IUGR) pups (17-19). In IUGR fetus, fetal brain and heart masses are increased relative to body weight, whereas relative kidney mass is unchanged suggesting a redistribution of the blood flow in favor of heart and brain (20). In adulthood, the IUGR offspring developed higher systolic blood pressure (20). Compared to controls, female

IUGR offspring exhibit higher expression of atrial natriuretic peptide (ANP) and decreased aconitase activity in the cardiac left ventricle (21). Cardiac hypertrophy and diminished contractility of the cardiomyocytes were also observed suggesting cardiac remodelling (21).

In view of the above, we hypothesize that adverse fetal environment could promote an earlier utilisation of lipid oxidation instead of glucose for energy production in the fetal heart because of a redistribution of cardiac output to the heart. The objectives were to compare fetal heart of IUGR fetus with their control counterparts 1) the protein expressions of CPT1 α , ACSL1 and VDAC1 2) the gene expression of mitochondrial cytochrome b (mt_Cytb) as a marker of hypertrophy by numbers of mitochondria, and finally 3) the activity of COX as a marker of β -oxidation activity. Therefore, the aim of the study was to understand the mechanism and the enzymes implicated in the fatty acids β -oxidation that could be expressed differently in fetal heart of control and IUGR rats and, consequently, could lead to cardiac complications.

MATERIALS AND METHODS

Animal protocol and tissue preparation

Experimental procedures were reviewed and approved by the institutional Animal Care Committee, accredited by the Canadian Council on Animal Care. Female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada, St-Constant, Quebec, Canada) weighing between 225-250 g were mated with males. The presence of spermatozoa in the morning vaginal smears was determined as day 1 of gestation (term = day 23). All animals were housed under controlled

lighting (6AM-6PM) and temperature (21°C) and had unrestricted access to food. The dams were randomly assigned to 1 of 2 diets for the last 7 days of gestation. The control group was fed a normal diet with 0.20% sodium and 0.40% potassium (normal diet 5755; PMI Feed Inc., Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada) and tap water. The IUGR group received a low sodium diet containing 0.03% sodium and 0.85% potassium (low-sodium diet 5881; PMI Feed Inc.) and demineralized water. The composition of both control and low-sodium diet was similar in protein (19%), carbohydrate (60.6%) and fat (10%) content. On day 22 of gestation, animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed by decapitation (9AM - 9:30AM). The uteri were removed and placed in a dissection dish and the fetuses were quickly removed weighed and separated by sex. Thereafter, fetuses were decapitated and hearts removed. For molecular analyses, tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further use. For mitochondria isolation and enzymatic activity, hearts were processed immediately.

Whole cell lysates preparation and mitochondrial isolation

For total cell lysates, whole hearts were used. Briefly, hearts of two animals of the same sex and same litter were pooled (n=1) and were homogenized in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, complete free EDTA protease cocktail inhibitor (Roche, Indianapolis, Indiana, USA)) to be centrifuged at 12 000 g for 30 minutes at 4°C. Supernatant was collected and kept at -80°C until used for protein expression.

Mitochondria were isolated with a commercial kit (Mitochondrial isolation kit for tissue, ab110168, Abcam, Toronto, Ontario, Canada). Briefly, hearts of five animals of the same sex and same litter were pooled (n = 1). Then, they were homogenized in the isolation buffer, centrifuged at 1000 g for 10 minutes at 4°C. Supernatants collected were then centrifuged at 12 000 g for 15 minutes, pellets resuspended in isolation buffer containing 1X complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, Indiana, USA) and centrifuged at 12 000 g for 15 min. The pellets were resuspended in isolation buffer containing protease inhibitor. An aliquot of one hundred μ L of the mitochondrial isolation preparation was snap-frozen in nitrogen and kept for the enzymatic activity measure. The other part was kept in Laemmli with β -mercaptoethanol and has been boiled before snap frozen and placed at -80°C.

CPT1 α , ACSL1 and VDAC1 protein expression

Proteins (whole cell of mitochondrial preparation, see details in table 1) were separated on SDS-PAGE gels and then transferred electrophoretically on nitrocellulose membranes (Fisher Scientific, Nepean, Ontario, Canada). Membranes were blocked with 5% non-fat milk in phosphate buffer saline (PBS: 1.4 M NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 17.6 mM KH₂PO₄, pH 7.4) with 0.1% Tween-20 (PBST) and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C (details in table 1) washed with PBST 0.1% and exposed to appropriate horseradish peroxidase-conjugated (HRP) secondary antibody (donkey anti-rabbit or sheep anti-mouse IgG from Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) at room temperature for 45 minutes. Equal protein loading was determined on the same membrane with a

mitochondrial marker, the cytochrome c oxidase subunit 4 (COX IV) antibody. Immunoreactive bands were visualized with the ECL Western blotting analysis system (GE HealthCare Biosciences Inc., Montreal, Quebec, Canada) and quantified by Alpha Imager software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California, USA). Results were expressed as densitometry units relative to COX IV.

CPT1a gene expression

For RNA isolation, total RNA from one fetal heart (n = 1) was extracted using RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was established by absorbance measurement at a wavelength of 260 nm while integrity of the samples was ascertained by the 260/280 nm ratio and sample quality verified by ethidium bromide fluorescence.

Single-stranded cDNA was generated by RT (QuantiTect Reverse Transcription kit; Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) using 0.75 µg of total RNA according to the procedure detailed by the manufacturer and the Biometra TGradient Thermocycler (Montreal Biotech Inc., Kirkland, Quebec, Canada). The cDNA obtained were kept at -20°C. For the quantitative PCR, primers were designed with Vector NTI® software (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) using sequence data from the national center for biotechnology information (NCBI) database (table 2). PCR product was amplified using QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) and the DNA Engine Opticon 2 (MJ research, Scarborough, Ontario, Canada) apparatus with Opticon Monitor software (Uracil-DNA glycosylase: 2 min at 50°C, Ploymerase activation: 15 min at 95°C, Denaturation: 15 sec

at 94°C, Annealing: 30 sec at 62°C, Stretching: 30 sec at 72°C and Melting curve: from 60°C to 90°C) for 45 cycles to measure CPT1 α gene. Each reaction was prepared with 2.5 μ L of cDNA, 12.5 μ L 2x QT SYBR Green PCR Master Mix, 1.5 μ L Primer and 8.5 μ L of RNase-free water. Each sample was amplified in triplicate. As Polr2a and Rpl4 were both recognized as good controls for the heart, they were tested in the present animal model. Since Rpl4 showed a better stability and lower variability, it was chosen as internal standard. The purity of the sample was verified with the melting curve.

Evaluation of the number of mitochondria

Number of mitochondria was evaluated by quantification of the mt_Cytb in order to determine if metabolic activity was increased (22). The DNA isolation was similar to the RNA isolation. Total DNA from one fetal heart (n = 1) was extracted by using DNeasy Blood Tissue kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) as described by the manufacturer. Each sample was snap-frozen in nitrogen and kept at -80°C. Primers for mt_Cytb and phosphoglycerate kinase 2 (PGK2, use as intern control) were designed with Vector NTI® software (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) using sequence data from the national center for biotechnology information (NCBI) database (table 2). Quantitative PCR was prepared with the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) for Mt_Cytb gene. The DNA Engine Opticon 2 apparatus and Opticon Monitor software with the same protocol as described in RNA extraction. Each reaction was prepared with 2.5 μ L of cDNA, 12.5 μ L 2x QT SYBR Green PCR Master Mix, 1.5 μ L Primer and

8.5 µL of RNase-free water. Each sample was amplified in triplicate. The internal control used was the gene PGK2. The melting curve allowed determining the purity of the sample.

Cytochrome c oxidase assay

Cytochrome c oxidase (COX) activity was measured using a commercial kit according to the procedure detail by the manufacturer (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) using mitochondrial preparation. Briefly, ferrocytochrome c is added to the preparation and its oxidation by COX was measured by the decreased absorbance at 550 nm 25°C. A total of 6 readings were done per samples. Pure cytochrome c oxidase from equine heart was used as a positive control. The negative control contained Assay Buffer, Enzyme dilution buffer and ferrocytochrome c substrate solution.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Results from molecular analysis were compared by two-factor ANOVA followed by Bonferroni post-tests analysis and the effect of IUGR and sex were compared to controls. Results for enzymatic activity of cytochrome c oxidase were analysed using linear regression where the best fits values were compared, the 95% confidence intervals were calculated and the deviation from zero to make sure that the experiment was done the right way without contaminant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of IUGR and sex on protein and gene expression of fatty acids pathway

As shown in figure 1A, mitochondrial expression of CPT1 α is increased in IUGR group of both sexes ($P < 0.01$ in males and $P < 0.001$ in females). The mRNA expression was similar between the different groups (Fig.1B) suggesting an increase in translation. Thus, CPT1 α expression was measured in whole cell lysates (Fig.1C). However, the CPT1 α protein expression is increased in IUGR females only ($P < 0.05$).

Since a complex of CPT1 α , ACLS1 and VDAC1 was suggested (10), their protein expressions were measured in mitochondrial and total cell lysates preparations. As shown in figure 2 A and B, ACSL1 protein expression was increased in both mitochondrial and whole cell preparations from IUGR females ($P < 0.01$). There is no difference in the expression of VDAC1 (Fig. 3A &B).

Effects of IUGR and sex on mitochondria, number of mitochondria and activity

In this model, cardiac ventricle-to-body ratio were increased in IUGR fetus compared to their controls (20) suggesting cardiac hypertrophy. Thus, to evaluate if there is remodeling or hypertrophic adaptation, number of mitochondria were evaluated by Mt_Cytb mRNA. No difference between IUGR and controls were observed (Fig.4).

Thus, the hypertrophic adaptation could result in increased mitochondrial activity. The cytochrome c oxidase is the 4th protein complex of the electron chain and was measured by the oxidation of ferrocytochrome c and is an index of mitochondrial activity. The results demonstrate a similar slope regression in each group (Male control: -0.096, Male IUGR: -0.100, Female control: -0.102, Female IUGR: -0.098). Positive (not shown) and negative controls (Fig.5) have been done to confirm the protocol efficiency. Finally, there is no difference of the activity of cytochrome c oxidase between the heart mitochondrial preparation of IUGR animals and their controls (Fig.5).

DISCUSSION

In a rat model of IUGR induced by maternal volume expansion during pregnancy, we have already shown an increased cardiac ventricle to body weight ratio in fetus and decreased contractility of cardiomyocytes in heart of adult females. Thus, the aim of this study was to evaluate if there is an alteration in fetal heart metabolism. We have demonstrated in IUGR fetuses compared to their controls: 1) an increase protein expression of CPT1 α and ACSL1 in mitochondria and in heart whole cell lysates in females without RNA expression increase, 2) an increased CPT1 α protein expression in mitochondria of males, and 3) no difference in VDAC expression, number of mitochondria and mitochondrial activity of COX.

In adult heart, overexpression of CPT1 α is associated with hypertrophy (10). This is a re-expression of the fetal phenotype. However, in the present model, cardiac protein expression of CPT1 α is greater in IUGR fetal heart compared to their controls. This could

explain the increased cardiac ventricle to body weight ratio observed in this fetus (20). Gene expression of CPT1 was not increased suggesting that protein translation is probably accelerated.

It was recently shown that CPT1 α forms a complex with ACSL1 and VDAC1 to transfer fatty acids through the mitochondrial outer membrane (13). We observed that ACSL1 followed the increase of CPT1 α in female IUGR only. In mice with a deletion of ACSL1 in adipose tissue, fatty acids incorporation was reduced by 50% (14). In heart ventricles knockout mice, a decreased β -oxidation was observed (24). In this study, the [14 C] palmitate oxidation was measured and a drop of 90% was notice in heart and in mitochondria. Moreover, an increase of 20% in [14 C] glucose oxidation was observed. These results suggest that a decrease of ACSL1 leads to a β -oxidation diminution and a glucose metabolism compensation which conduct to a cardiac hypertrophy. Therefore, regarding our results, the increase of CPT1 α and ACSL1 may lead to a raise in fatty acids β -oxidation.

However, the protein expression of VDAC1, that is a part of the complex, was similar in all groups. VDAC1 is present at high concentration on the mitochondrial membrane and play an important role in apoptoses (25). Overexpression of this protein has an impact on cellular death by releasing apoptotic proteins (16, 26, 27, 28). As VDAC1 is present at high concentration on the mitochondrial membrane (25) and three CPT1 α and three ACSL1 are associated with only one VDAC1, the quantity is probably sufficient.

The number of mitochondria was the same in both control and IUGR rats by measuring the mt_Cytb. Therefore, the activity of cytochrome c oxidase was measured as an index of

mitochondrial activity. No difference was observed between hearts from controls and IUGR fetus rats.

In the present study, increased CPT1 α protein expression was observed in heart of IUGR fetuses of both sexes while, ACSL1 was increased in females only. In fetus, this difference between sexes is difficult to explain by sex hormones levels. It was shown that vascular smooth muscle cells in culture react differently to growth stimuli after 40-45 passages depending of the sex of rat donors (29). In human, low birth weight was associated with higher systemic vascular resistance in boys at 7 to 9 years old and girls with increased cardiac sympathetic activation suggesting that sex-specific alterations is observed before puberty (30). Thus, the factors that are related to sex and independent of sexual hormones still remain to be elucidated.

In conclusion, in fetus whole heart and mitochondria, CPT1 α and ACSL1 were increased in female IUGR suggesting a raise in fatty acids β -oxidation. Modifications on fatty acids pathway can conduct to long-term consequences on a sex-specific manner.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the laboratory of Dr. Bichet (Université de Montréal) for technical support in PCR analysis.

GRANTS

The Canadian Institutes of Health Research (CIHR, Canada)

DISCLOSURES

Nothing to disclose

REFERENCES

1. **Szostak-Wegeierek D., Szamotulska K.** Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health. *Int J Womens Health.* 11;6:647-56, 2014
2. **Szostak-Węgierek D, Szamotulska K.** Fetal development and risk of cardiovascular diseases and diabetes type 2 in adult life. *Med Wieku Rozwoj.* 15(3):203-15. 2011
3. **Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L.** Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol.* 530:141-152.2001.
4. **Intapad S, Tull FL, Brown AD, Dasinger JH, Ojeda NB, Fahling JM, Alexander BT.** Renal denervation abolishes the age-dependent increase in blood pressure in female intrauterine growth-restricted rats at 12 months of age. *Hypertension.* 61(4):828-34.2013
5. **Hu X, Levya A, Harta E, Nolana L, Daltonb G, Levi A.** Intrauterine growth retardation results in increased cardiac arrhythmias and raised diastolic blood pressure in adult rats. *Cardiovasc Res.*;48:233-243, 2002
6. **Abo T.** Sequential shift of energy production pathways at the fetal stage and during lifetime. *Med Hypotheses.* 80(6):813-5. 2013
7. **Lopashuk GD, Jaswal JS.**Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J.Cardiovasc. Pharmacol.* 2:130-40.2010
8. **Rosca G.M, Tandler B, Hoppel L.C.** Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cell.* 112(1):113-22.2003

9. **Abel E.D, Doenst T**, Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 90(2): 234-42. 2011

10. **Lewandowski ED, K. Fischer S, Fasano M, H. Banke N, A. Walker L, Huq Ai, Wang X, D. Lopaschuk G, J. O'Donnell M.** Acute Liver Carnitine Palmitoyltransferase I Overexpression Recapitulates Reduced Palmitate Oxidation of Cardiac Hypertrophy. *Circ Res. (1):57-65.* 2013.

11. **Rotondo D, Davidson J.** Genetics and molecular biology: fatty acid metabolism in cancer cell survival; carnitine palmitoyltransferase-1 as a critical anticancer target. *Curr Opin Lipidol.* (5):428-9. 2011

12. **Jogl G, Tong L.** Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport. *Cell.* 10; 112 (1):113-22. 2003

13. **Lee K, Kerner J. and L. Hoppel C.** Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferase 1a (CPT1a) Is Part of an Outer Membrane Fatty Acid Transfer Complex. *JBC Papers* DOI 10.1074/jbc.M111.228692. 2011

14. **M. Ellis J, O. Li L, Wu P-C, R. Koves T, Ilkayeva O, D. Stevens R, M. Watkins S, M. Muoio D, and A. Coleman R.** Adipose acyl-CoA synthetase-1 (ACSL1) directs fatty acids towards β -oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab.* 7;12(1):53-64. 2010

15. **J. Durgan D, K. Smith J, A. Hotze M, Egbejimi O, D. Cuthbert K, G. Zaha V, R. B. Dyck J, E. Abel D and E. Young M.** Distinct transcriptional regulation of long-chain acyl-CoA synthetase isoforms and cytosolic thioesterase 1 in the rodent heart by fatty acids and insulin *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H2480-H2497, 2006

16. **Martel C, Wang Z, Brenner C.** VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate, *Mitochondrion*, 2014

17. **Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, and Brochu M.** Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *American journal of obstetrics and gynecology* 180: 608-613, 1999.
18. **St-Louis J, Sicotte B, Beauséjour A, Brochu M.** Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction*. 131(2):331-9. 2006
19. **Bedard S, Sicotte B, St-Louis J, and Brochu M.** Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol* 562: 937-950, 2005.
20. **Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, and Brochu M.** Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E124-131, 2002.
21. **Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, and Brochu M.** Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 565: 197-205, 2005.
22. **Mahjoub SZ, Mehri S, Ourda F, Finsterer J, Arab SB.** Novel m.15434C>A (p.230L>I) Mitochondrial Cytb Gene Missense Mutation Associated with dilated cardiomyopathy. *ISRN Cardiology*. 2012:251723, 2012.
23. **Miniaci MC, Bucci M, Santamaria R, Irace C, Cantalupo A, Cirino G, Scotto P.** CL316.243, a selective β 3-adrenoceptor agonist, activates protein translation through mTOR/p70S6K signaling pathway in rat skeletal muscle cells. *Pflugers Arch*. (4):509-16. 2013

24. **M. Ellis J, M. Mentock S, A. DePetrillo M, R. Koves T, Sen S, M. Watkins, M. Muoio D, W. Cline G, Taegtmeier H, I. Shulman G, S. Willis M and A. Coleman R.** Mouse Cardiac Acyl Coenzyme A Synthetase 1 Deficiency Impairs Fatty Acid Oxidation and Induces Cardiac Hypertrophy. *Mol Cell Biol.* (6):1252-62. 2011
25. **Geula S, Naveed H, Liang J, Shoshan-Barmatz V.** Structure-based Analysis of VDAC1 Protein, *J Biol Chem*, 287(3): 2179–2190. 2012
26. **Kerner J, Lee K, Tandler B, Hoppel CL.** VDAC proteomics: post-translation modifications. *Biochim Biophys Acta.* 1818(6):1520-5. 2012
27. **Weisthal S, Keinan N, Ben-Hail D, Arif T, Shoshan-Barmatz V.** Ca(2+)-mediated regulation of VDAC1 expression levels is associated with cell death induction. *Biochim Biophys Acta.* 1843(10):2270-81. 2014
28. **Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D. and Sheu S.S.** The Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC): Function in Intracellular Signalling, Cell Life and Cell Death. *Curr Pharm Des.* 12 (18):2249-70. 2006
29. **Bacáková L¹, Pellicciari C, Bottone MG, Lisá V & Mares V.** A sex-related difference in the hypertrophic versus hyperplastic response of vascular smooth muscle cells to repeated passaging in culture. *Histol.Histopathol*, 16 (3):675-84. 2001
30. **Jones A1, Beda A, Osmond C, Godfrey KM, Simpson DM & Phillips DI.** Sex-specific programming of cardiovascular physiology in children. *Eur Heart J*, 29(17):2164-70. 2008

TABLES

TABLE 1 : Western blot details

Protein	SDS-PAGE concentration (%)	Amount loaded (µg/well)	Primary Anti-body		Secondary Antibody
			Dilution	From	
CPT1α	10	50	1 : 2 000	Abcam ab128568	Anti-Mouse 1 : 10 000
CPT1α (mito)	10	5	1 : 2 000	Abcam ab128568	Anti-Mouse 1 : 5 000
ACSL1	8	50	1 : 1 000	Cell signaling technology # 40475	Anti-Rabbit 1 : 10 000
ACSL1 (mito)	10	5	1 : 1 000	Cell signaling technology # 40475	Anti-Rabbit 1 : 5 000
VDAC1	12	50	1 : 1 000	# 1240120	Anti-Mouse 1 : 10 000
VDAC1 (mito)	15	5	1 : 1 000	# 1240120	Anti-Mouse 1 : 5 000
COXIV	15	50	1 : 10 000	Abcam ab16056	Anti-Rabbit 1 : 10 000
COXIV (mito)	15	5	1 : 5 000	Abcam ab16056	Anti-Rabbit 1 : 5 000

TABLE 2: Primer design used for RT-PCR

GENE	PRIMERS	CONDITIONS
CPT1α	FP: CACATTTCCAGGAAGCAGAGTACCACC RP: GTAAGGGGAAGCAGCATCCTCACATA	%GC: 51.9 Tm: 61.9 %GC: 50.0 Tm: 60.5 Size (bp) : 165
RPL4	FP: TGGACTGAAAGTGCTTTCCGGAAG RP: GTGCTCGAAGGGCTCTTTGGATC	%GC: 50.0 Tm: 60.4 %GC: 56.5 Tm: 60.0 Size (bp) : 491
POLR2a	FP: ATTGTATCCGTACTIONCACAGCACCCATCC RP: TGGACCAGAGAGCCTGCTGATGTG	%GC: 50.0 Tm: 62.9 %GC: 58.3 Tm: 62.3 Size (bp) : 242
PGK2	FP: GGCCCTTCCTGGCTATTCTTGGT RP: GTGAAAGCCATCGCACCACCA	%GC: 56.5 Tm: 60.5 %GC: 57.1 Tm: 60.3 Size (bp) : 112
Mt_Cytb	FP : CAGTCATAGCAACTGCATTTCATGGGC RP: CATTCTGACTAGGGTAGTCCCAATGTAAGGG	%GC: 50.0 Tm: 62.5 %GC: 50.0 Tm: 63.5 Size (bp) : 124

FP = Forward Primer (5' → 3') ; RP = Reverse Primer (5' → 3')

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CPT1 α [*CPT1a*] expression in heart of male and female fetuses of 22 days. (A) Heart mitochondrial protein expression, n=6. (B) Gene expression expressed as a ratio of the CPT1 α gene on *Rpl4* gene, n=6. (C) Protein expression in heart total cell lysates, n=5. Results are expressed as a ratio of protein CPT1 α on *COX IV* expression. Representative western blot is shown; CPT1 α : 86 kDa, COX IV: 16 kDa. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

Figure 2: ACSL1 [*ACSL1*] expression in hearts of male and female fetuses of 22 days. (A) Heart mitochondrial protein expression, n=6 and (B) Protein expression in heart total cell lysates preparation, n=5. Results are expressed as a ratio of protein ACSL1 on *COX IV* expression. Representative western blot is shown; ACSL1: 75 kDa, COX IV: 16 kDa. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. ** $P < 0.01$ vs control.

Figure 3: VDAC1 [*VDAC1*] expression in hearts of male and female fetuses of 22 days. (A) Heart mitochondrial protein expression, n=6 and (B) Protein expression in heart total cell lysates preparation, n=5. Results are expressed as a ratio of the protein VDAC1 on *COX IV* expression. Representative western blot is shown; VDAC1: 31 kDa, COX IV: 16 kDa. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups.

Figure 4: Gene expression of Mt_Cytb [*Mt_Cytb*] in hearts from male and female fetuses of 22 days. Control (white bars) and IUGR (gray bars) groups. Results are expressed as a ratio of the gene Mt_Cytb on *PGK2* gene.

Figure 5: Enzymatic activity of Cytochrome c oxidase in hearts of male and female fetuses of 22 days, n=6. Results are expressed by a linear regression of the absorbance at 550 nm over time (in sec). Control (straight line) and IUGR (dotted line), male (▲) and female (●).

FIGURES

Figure 1

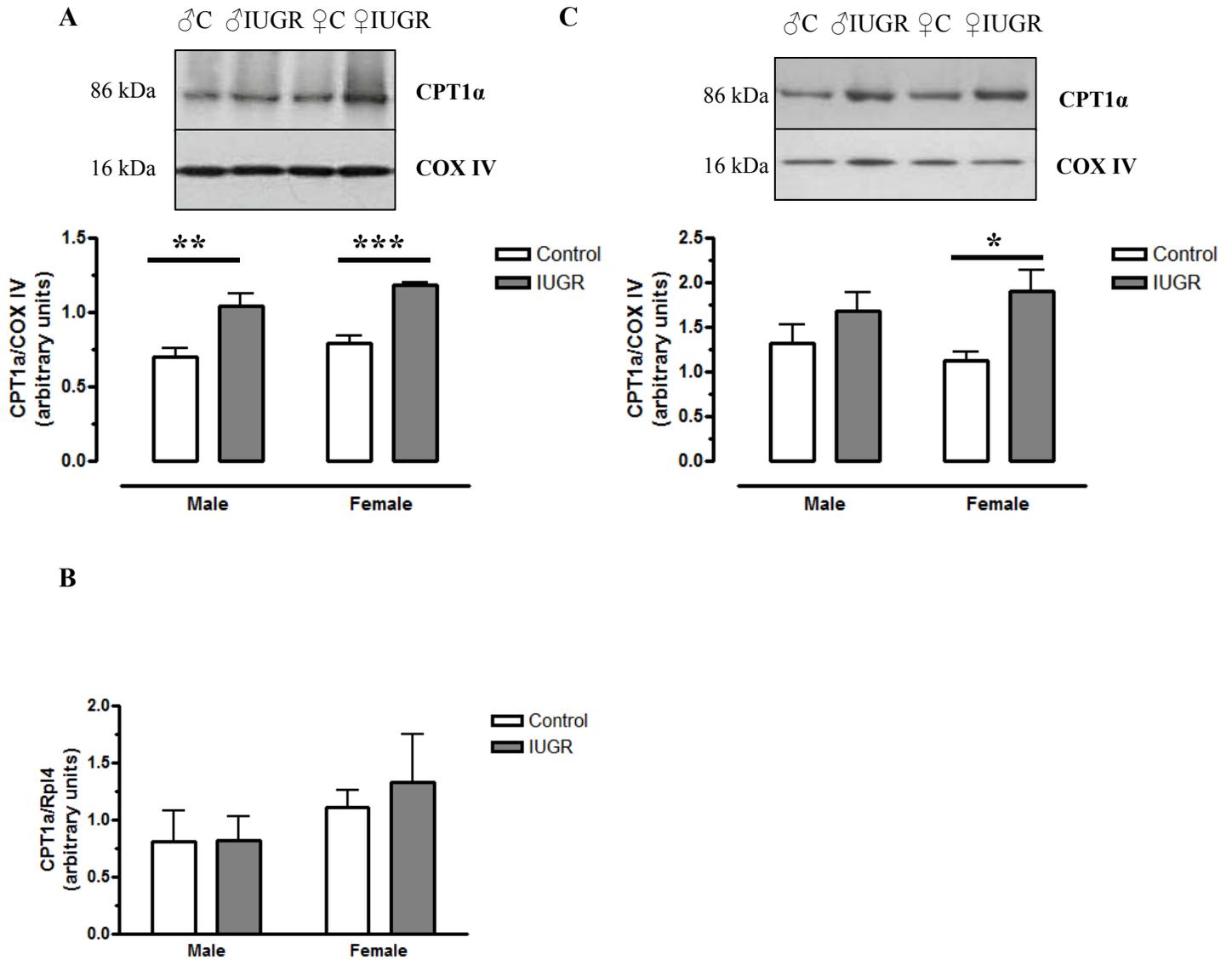


Figure 1: *CPT1α* [*CPT1α*] expression in heart of male and female fetuses. **(A)** Protein expression in heart mitochondria, n=6 **(B)** Gene expression, n=6 **(C)** Protein expression in heart, n=5

Figure 2

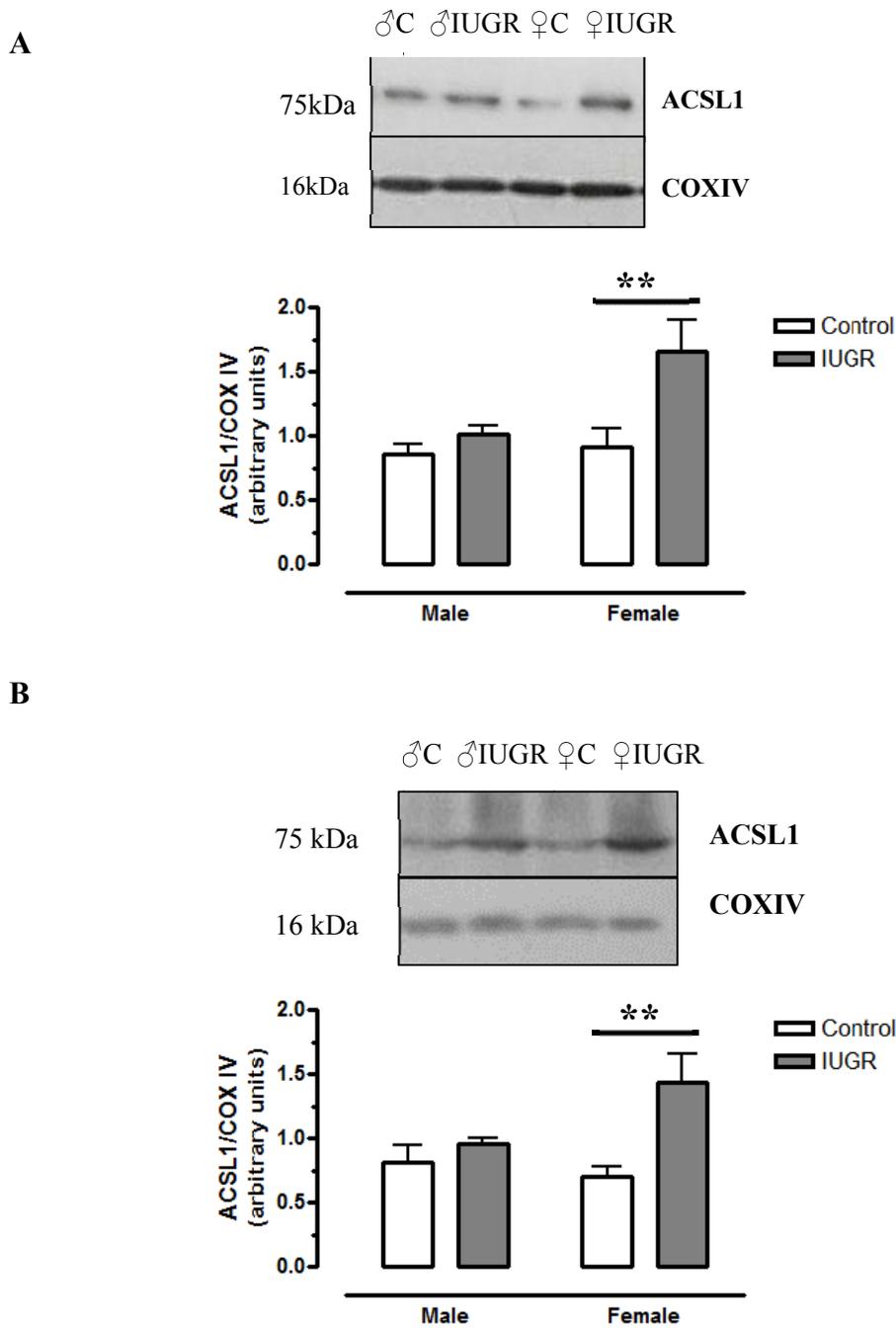


Figure 2 : ACSL1 [*ACSL1*] expression in hearts of male and female fetuses. **(A)** Protein expression in heart mitochondria, n=6 **(B)** Protein expression in heart, n=5

Figure 3

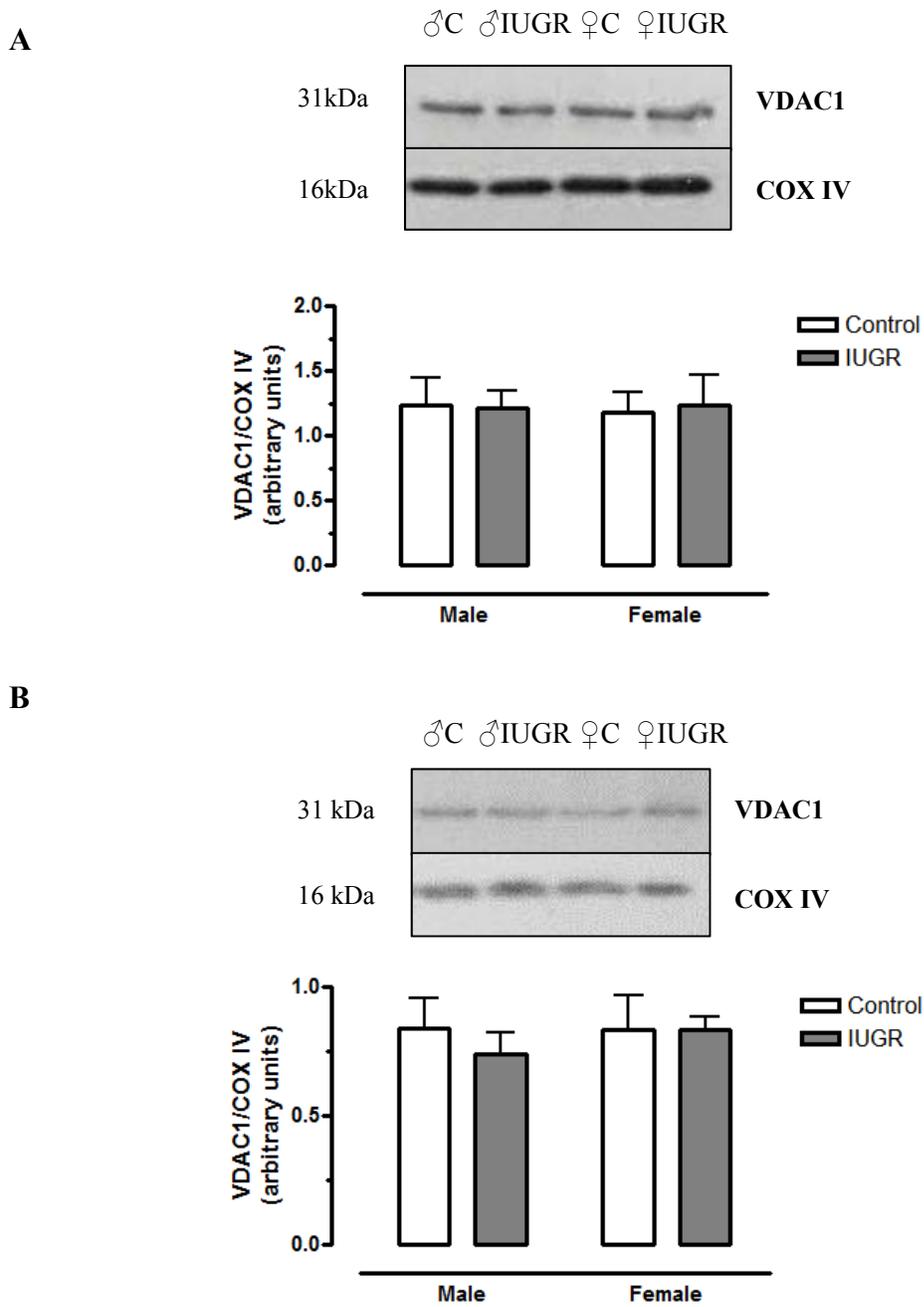


Figure 3: VDAC1 [*VDAC1*] expression in hearts of male and female fetuses. **(A)** Protein expression in heart mitochondria, n=6 **(B)** Protein expression in heart, n=5

Figure 4

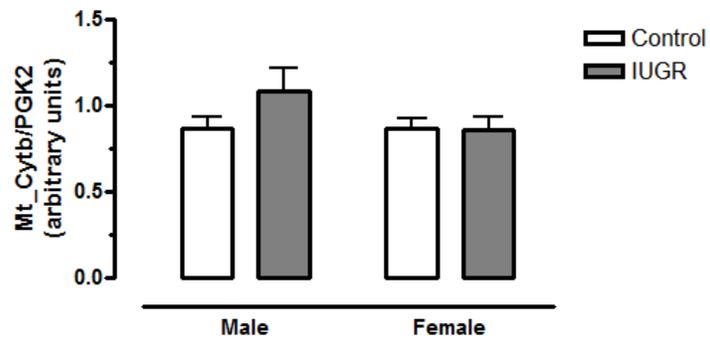


Figure 4: Gene expression of Mt-Cytb [*Mt_Cytb*] in hearts from male and female fetuses

Figure 5

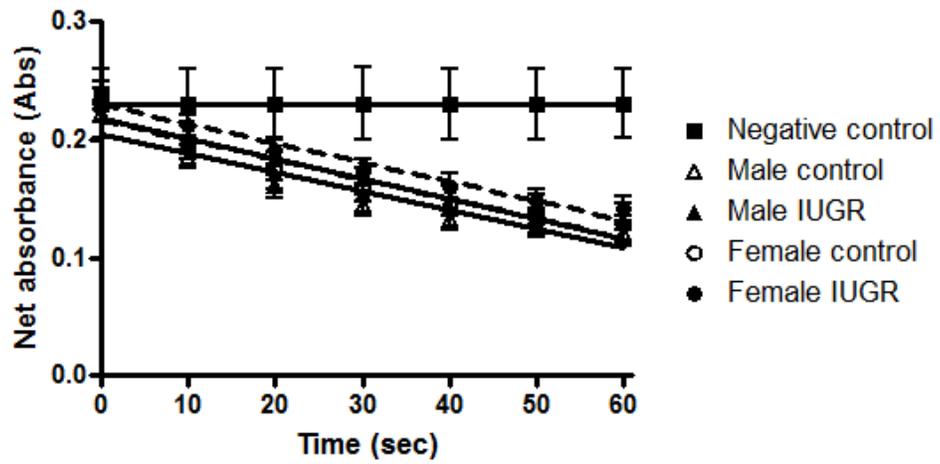


Figure 5: Enzymatic activity of Cytochrome c oxidase in hearts of male and female fetuses, n=6.

3. Discussion

3.1 Point de vue sur les résultats obtenus

Le modèle de restriction de croissance intra-utérine utilisé dans le laboratoire a été caractérisé au cours des 10 dernières années (Battista et al., 2005, Battista et al., 2002, Bedard et al., 2005, Bibeau et al., 2011). Les fœtus sont plus petits en poids et en grandeur et démontrent des ratios cerveau et cœur sur le poids total augmentés indiquant une redistribution du flow sanguin vers les organes vitaux (Battista et al., 2002). Dans le modèle de rat RCIU, une augmentation du volume des cardiomyocytes et une diminution de leur contractilité ont été observées dans les cœurs de femelles adultes (Battista et al., 2005). Les données recueillies ont également démontrées une augmentation de la longueur des sarcomères ainsi qu'une paroi ventriculaire plus mince. Ce changement du volume des myocytes apparaîtrait durant la période d'hypertrophie compensatoire (Onodera et al., 1998). De plus, la réponse contractile pourrait être affectée par une perturbation de l'environnement ionique intracellulaire dû au changement dans la longueur des sarcomères (Powell et al., 2004). Dans la présente étude, notre hypothèse se basait sur le fait que le transfert de la voie de l'utilisation du glucose vers l'utilisation des acides gras se ferait plus tôt chez les fœtus RCIU. Notre objectif, quant à lui, était de comprendre les mécanismes et les enzymes impliqués dans la β -oxydation des acides gras qui seraient exprimés différemment dans les cœurs fœtaux témoin et RCIU et pourraient donc entraîner des complications au niveau cardiaque. Nous avons démontré chez les animaux RCIU, comparativement aux contrôles 1) une augmentation de l'expression protéique de CPT1 α et ACSL1 dans les mitochondries et le cœur chez les femelles et ce, sans expression d'ARN augmentée, 2) une augmentation de l'expression protéique de CPT1 α dans les

mitochondries de mâles et 3) aucune différence dans l'expression protéique de VDAC1, dans le nombre de mitochondries et dans l'activité de COX.

Premièrement, nous avons mesuré l'expression protéique de CPT1 dans les cœurs fœtaux et les mitochondries. Les résultats ont démontré une augmentation de cette protéine dans les cœurs des femelles ayant subi une RCIU ainsi qu'une tendance dans le même sens chez les mâles. En isolant les mitochondries, les résultats se sont avérés différents en révélant une augmentation de CPT1 non seulement chez les femelles, mais également chez les mâles RCIU. Une étude récente a révélé quelques points communs entre la surexpression de CPT1 α et l'hypertrophie cardiaque (Lewandowski et al., 2013). Selon eux, la concentration de CPT1 α serait plus élevée dans les cœurs fœtaux et les cœurs hypertrophiés où il y a une faible concentration d'acides gras à longues chaînes. Dans leur modèle, l'augmentation du transporteur de la carnitine impliquerait étonnamment une réduction de l'oxydation du palmitate, un acide gras à longue chaîne, donc une diminution de la β -oxydation. C'est pourquoi le malonyl-CoA a été mesuré pour s'assurer qu'il n'inhibait pas le CPT1 α davantage (Figure 9, p.29). Il s'est révélé inchangé. En concluant leurs résultats, ils ont observé une quantité élevée du peptide natriurétique auriculaire (ANP), facteur impliqué dans l'hypertrophie cardiaque, comme celle observée sur notre modèle, et a donc émis l'hypothèse que l'augmentation de CPT1 α induirait un remodelage métabolique mimant le signal hypertrophique ce qui expliquerait l'augmentation de l'ANP (Lewandowski et al., 2013). D'autres auteurs ont démontré que la surexpression de CPT1 α entraînait une augmentation de l'oxydation des acides gras à longues chaînes (Jambor de Sousa et al., 2005). Toutefois, combiné à une augmentation du palmitate, ces effets peuvent affecter la viabilité de la cellule. Il serait donc important, dans notre modèle, de mesurer tous ces éléments. Par contre, nous

aimerions d'abord mesurer un facteur qui influence directement la carnitine palmitoyltransférase 1-alpha, soit le malonyl-CoA (Figure 9, p.29).

L'augmentation protéique de CPT1 α alors que l'expression génique n'est pas augmentée a déjà été observée. En effet, des études sur des souris dont le gène du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes alpha (PPAR α) a été retiré ont révélé une augmentation de l'expression protéique du transporteur CPT1 α , mais pas de l'expression génique (Chatelain et al., 1996, Louet et al., 2001). Par contre, une recherche effectuée sur un modèle de RCIU induit par une diète riche en gras donnée à la mère, a démontré une augmentation de l'expression génique de CPT1 α dans le foie uniquement et s'avère donc inchangé dans le cœur (Cook et al., 2001). Cette augmentation protéique découverte nous amène à penser que la β -oxydation des acides gras serait également augmentée même si une étude externe vue précédemment atteint des résultats différents démontrant une diminution de la β -oxydation lorsque CPT1 α est augmenté. (Lewandowski et al., 2013). De plus, l'hypothèse du complexe de transfert des acides gras reste une bonne voie à explorer (Lee et al., 2011). Elle suppose l'interaction de CPT1 α , de l'Acyl-Coenzyme A synthétase à longue chaîne (ACSL) et du canal à anion voltage-dépendant (VDAC) pour créer un complexe permettant de gérer la perméabilité de la membrane mitochondriale et l'accès des acides gras à longues chaînes à l'intérieur de celle-ci.

Nous avons conclu qu'ACSL1 suivait le même sens que CPT1 α en révélant une augmentation chez les femelles RCIU uniquement. Une surexpression de cette protéine pourrait prévenir le stress oxydatif et la dysfonction mitochondriale (Hinder et al., 2014). Toutefois, une diminution de l'ACSL1 réduirait l'oxydation des acides gras (Ellis et al., 2010,

Ellis et al., 2011) et une augmentation de son ARNm pourrait découler de conditions lipogénique et oxydative surélevées (Li et al., 2006, Mashek et al., 2004). Pour notre part, nous n'avons pu mesurer l'expression génique d'ACSL1, mais nous l'envisageons fortement. Nous souhaitons vérifier si ACSL1 sera également inchangé au niveau de l'ARNm, tel que CPT1 α en analysant les résultats de l'expression génique, puisqu'ils augmentent tous deux au niveau protéique. L'augmentation des deux protéines ACSL1 et CPT1 α , suggère que l'entrée des acides gras à l'intérieur de la mitochondrie est favorisée.

VDAC1 est la dernière protéine qui ferait partie d'un complexe avec CPT1 α et ACSL1. Nos résultats ont démontré que l'expression protéique de VDAC1 était inchangée dans tous les groupes. Nous suggérons que VDAC1 est normalement présent en forte concentration sur la membrane mitochondriale, puisqu'il joue un rôle important dans l'apoptose. Une surexpression de cette protéine entraînerait un relâchement de protéines apoptotiques (Weisthal et al., 2014, Martel et al., 2014, Kerner et al., 2012, Shoshan-Barmatz et al., 2006). Également, VDAC1 confère la perméabilité de la membrane externe au Ca²⁺ en gérant son accès à la mitochondrie (Rizzuto et al., 2012). Pour fonctionner, le complexe en question doit contenir trois CPT1 α et trois ACSL1 pour seulement un VDAC1. Nous suggérons que CPT1 α et ACSL1 se rapprochent et se lient à VDAC1 qui serait déjà présent sur la membrane mitochondriale (Figure 10, p.30).

L'augmentation de CPT1 α et d'ACSL1 suggère l'activation d'un nombre plus élevé de canal, mais les mesures obtenues de VDAC1, démontrant aucun changement entre les différents groupes, vont à l'encontre de cette hypothèse.

La quantité de mitochondries présentes dans les cellules de chacun des groupes a été mesurée. Tout d'abord, le contrôle interne utilisé pour les immuno-buvardages de type Western est une protéine mitochondriale. En s'assurant que le nombre de mitochondries étant le même, nous avons confirmé qu'il s'agissait d'un contrôle fiable. Ensuite, le cœur des fœtus RCIU étant plus gros, nous voulions mieux comprendre son mécanisme afin de prévenir les conséquences à l'âge adulte. Les mitochondries sont reconnues pour leur capacité à se multiplier par elles-mêmes lorsque les besoins en énergie de la cellule augmentent. Pour ce faire, elles utilisent le processus de fission/fusion. Il est également possible que les crêtes mitochondriales aient pris du volume ou qu'elles se soient multipliées. C'est aussi une caractéristique qu'ont les mitochondries pour subvenir aux besoins de la cellule. Nous envisageons donc de vérifier ce questionnement par microscopie électronique.

Nous n'avons pas encore étudié la voie de l'adénosine monophosphate (AMP) et croyons qu'elle peut être une voie intéressante à analyser. L'AMP est impliquée dans l'activation de l'acyl CoA décarboxylase (ACC). Cette voie se termine avec le malonyl-CoA qui joue le rôle d'inhibiteur de la carnitine palmitoyltransférase (CPT1). Le malonyl-CoA décarboxylase (MCD) est l'enzyme régulant le malonyl-CoA qui est lui-même régulé par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) préalablement inactivé par l'adénosine monophosphate protéine kinase (AMPK) (Figure 10, p.30). Plusieurs facteurs peuvent influencer la sensibilité de CPT1 α pour l'inhibition du malonyl-CoA, l'insuline est l'un de ces facteurs (Park et al., 1995). De plus, certaines protéases peuvent également avoir cet effet. Le nagarse est une protéase souvent utilisé pour isoler les mitochondries. Malheureusement, elle peut intervenir au niveau du malonyl-CoA et n'est donc pas recommandée pour nos isolations en raison des résultats obtenus lors d'une étude sur CPT1 α (Madiraju S., 1987).

Une autre voie métabolique pourrait être un sujet futur. Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) contrôlerait la transcription enzymatique des gènes nucléaires des acides gras (Varga et al., 2011, Alaynick, 2008). Trois isoformes de PPAR se trouvent dans le cœur : PPAR α , PPAR γ et PPAR β/δ . Plusieurs études ont accordé un rôle cardiaque important à PPAR γ . Par exemple, une étude a démontré chez des souris transgéniques PPAR γ que l'expression cardiaque des gènes de l'oxydation des acides gras tels que l'acyl-CoA oxydase (AOX), la FA translocase (CD36), la FA synthase (FAS) et CPT1, était augmentée ainsi que l'utilisation des lipoprotéines triglycérides. Ces résultats suggèrent que PPAR γ aurait plusieurs effets bénéfiques sur le myocarde, mais inversement son absence pourrait aussi mener à la détérioration de la fonction cardiaque (Son et al., 2007, Vikramadithyan et al., 2005) De plus, il a été démontré que PPAR α et PPAR γ pourraient moduler l'activité de l'adénosine monophosphate protéine kinase activée (AMPK), qui elle agit sur le malonyl-CoA (Lee and Kim, 2010) et pourrait même être favorisé par le co-activateur gamma de PPAR (PGC-1)(B. Vega et al., 2000, Alaynick, 2008). Toutes ces études confirment que PPAR est un récepteur important à analyser dans notre modèle. Également, il semblerait que l'activation de PPAR γ favoriserait l'oxydation du glucose cardiaque ainsi que la fonction contractile du cœur (S. Golfman et al., 2005).

En résumé, nos expériences ont su révélé une surexpression de la carnitine palmitoyltransférase 1-alpha (CPT1 α) et de l'Acyl-CoA synthétase à longue chaîne membre 1 de la famille (ACSL1) autant dans les cœurs fœtaux que dans les isolats mitochondriaux et ce, chez les femelles RCIU seulement. Le canal VDAC1 est inchangé dans tous les groupes. La quantité de mitochondries dans les cellules ainsi que leur activité n'ont révélé aucune différence entre les groupes. Nos résultats suggèrent que les modifications dans la voie des

acides gras observés dans notre modèle de RCIU pourraient conduire progressivement à des conséquences à court et long terme de façon sexe-spécifique.

3.2 Limites expérimentales

Le rat était pour nous un modèle idéal. Nous avons choisi un rongeur présentant une très grande variance génétique afin de mimer la diversité chez l'humain. Les rats Sprague-Dawley ont démontré des données d'une grande variabilité rendant les expérimentations légèrement plus longues et complexes. Par exemple, afin d'obtenir des résultats plus clairs, un plus grand nombre de sujets étaient nécessaires. Pour chaque expérience, cinq à six portées étaient nécessaires afin de recueillir de deux à trois cœurs pour chaque sexe. Pour certains protocoles, nous considérons que ce nombre pourrait être augmenté. De plus, cela rend les contrôles positifs et internes difficiles à trouver et demande beaucoup d'essais. Toutefois, cela demande beaucoup de précision dans l'accomplissement des protocoles afin de choisir le contrôle idéal et le plus stable possible. Ces limites nous permettent d'être précis dans nos expérimentations et nos choix de protocoles, d'anticorps ou de contrôles afin que nos résultats soient très clairs et significatifs. Essentiellement, il nous permet d'identifier les mécanismes que nous étudions afin de mieux comprendre les effets chez l'humain.

Le modèle de restriction de croissance développé au laboratoire est très peu utilisé par les autres laboratoires. Il est plus commun d'administrer une diète faible en protéines ou en graisses. En donnant une diète faible en sel, notre modèle ne représente pas la société actuelle où la consommation de sel est très importante. Toutefois, le but principal était de provoquer

une diminution de la perfusion placentaire afin d'établir un environnement fœtal défavorable et donc de provoquer une restriction de croissance chez le fœtus. Par contre, que les diètes soient d'origine protéique, grasseuse, sucrée, calorique, vitaminique ou sodique, elles ont toutes leurs effets particuliers affectés par le type de diète. Par exemple, le sel influence l'état isotonique de la cellule ainsi que les fonctions rénales affectant la quantité et la concentration de l'urine et conduit à la déshydratation.

Pour les études sur les fœtus, nous avons utilisé des cœurs complets plutôt qu'isoler uniquement les ventricules gauches tel qu'effectué chez les rats adultes. Nous avons procédé de cette façon pour plusieurs raisons énumérées ci-dessous, mais nous souhaitons éventuellement travailler sur les ventricules seulement. Tout d'abord, comme nous avons effectué l'isolation de mitochondries, d'ARN et d'ADN, nous avons un meilleur rendement en utilisant des cœurs complets. Également, l'isolation des ventricules gauche de cœurs fœtaux doit se faire de manière très précise, minutieuse et sous un microscope afin de ne pas endommager le tissu. Comme nous travaillons à partir de tissus congelés, nous nous assurons qu'ils soient le plus frais possibles et gelés instantanément dès le prélèvement. À l'âge adulte, l'isolation du ventricule gauche des cœurs de rats se fait très rapidement suite au prélèvement, ce qui n'altère pas notre méthode de congélation et permet la précision de nos résultats.

3.3 Perspectives

Comme discuter précédemment, nous aimerions mieux comprendre le métabolisme des acides gras en lien avec la β -oxydation et à la fois mesurer le taux de carnitine cytosolique en le comparant à celui contenu à l'intérieur de la mitochondrie afin de mesurer l'activité de CPT1 α . D'un autre côté, nous aimerions mesurer les effets du malonyl-CoA sur le transporteur de la carnitine ainsi que toute la voie qui en découle, incluant les mesures de l'AMPK et son action sur CPT1 α .

Le rôle cardiaque de PPAR étant très large, il serait logique d'aller dans cette direction. Avec son co-activateur PGC-1, PPAR a déjà démontré des effets intéressants pouvant concerner notre modèle. PPAR se trouve sous trois isoformes dans le cœur. Il y a PPAR α , PPAR β/δ et PPAR γ . Ce dernier aurait un rôle cardiaque plus important et favoriserait l'oxydation du glucose ainsi que la fonction contractile. Il a également été remarqué qu'une augmentation de PPAR γ stimulerait l'expression des gènes de l'oxydation des acides gras. Nous croyons que PPAR γ pourrait alors être augmenté dans notre modèle. De plus, PPAR entre également en relation avec l'AMPK, il est donc possible qu'en étudiant une voie ou l'autre, il deviendra inévitable de travailler sur la prochaine. Les effets de l'épigénétique ne peuvent être mis de côté, mais nous aimerions demander de l'assistance à ce niveau, car il s'agirait d'une première pour le laboratoire.

Au niveau morphologique, nous aimerions observer les crêtes mitochondriales ainsi que l'aspect global des mitochondries. De plus, comme les mesures des cardiomyocytes ont été prises à douze semaines chez le rat, donc à l'âge adulte, nous aimerions répéter l'expérience avec les cœurs fœtaux. Également, nous aimerions observer les différences entre

plusieurs âges afin d'observer l'évolution des conséquences de la RCIU. Nous avons une bonne partie des données au niveau fœtal et à l'âge adulte. Pour compléter nos résultats, une semaine, cinq semaines, vingt semaines et quarante semaines de vie seraient des périodes à observer. Pour terminer, il pourrait être pertinent d'observer à tout âge les effets d'une stimulation ou d'un stress cardiaque, tel qu'une hypertrophie ventriculaire, afin de vérifier l'augmentation de la prédisposition aux maladies cardiaques et coronariennes.

Toutes les perspectives ici présentées nous permettront de mieux comprendre les effets d'un environnement fœtal défavorable en lien avec la malnutrition maternelle pouvant affecter la perfusion placentaire. Ainsi, nous pourrions en apprendre davantage sur l'incidence des maladies observées suite à une RCIU au cours du développement. De plus, nos études se faisant toujours de manière sexe-spécifique, nos résultats très différents d'un sexe à l'autre encouragerons sûrement d'autres laboratoires à en faire autant et ainsi à leur permettre de cibler les problèmes de manière plus spécifique afin de mieux venir en aide aux personnes concernées. À long terme, nous souhaitons que notre travail permette le développement d'un traitement préventif et/ou médicamenteux contre la RCIU et ses effets.

4. Bibliographie

A. LEON, D., O. LITHELL, H., VÅGERÖ, D., KOUPILOVÁ, I., MOHSEN, R., BERGLUND, L., LITHELL, U. & M. MCKEIGUE, P. 1998. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ* 317, 241–5.

ACOG 2013. American College of Obstetricians & Gynecologists, Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstet Gynecol.* , 121, 1122-1133.

ALAYNICK, W. A. 2008. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion*, 8, 329-37.

B. VEGA, R., M. HUSS, J. & P. KELLY, D. 2000. The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 20, 1868–1876.

BARKER, D. J. P. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*, 311.

BATTISTA, M. C., CALVO, E., CHORVATOVA, A., COMTE, B., CORBEIL, J. & BROCHU, M. 2005. Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol*, 565, 197-205.

BATTISTA, M. C., OLIGNY, L. L., ST-LOUIS, J. & BROCHU, M. 2002. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E124-31.

BEDARD, S., SICOTTE, B., ST-LOUIS, J. & BROCHU, M. 2005. Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol*, 562, 937-50.

BELCHER, S. M., GEAR, R. & KENDIG, E. L. 2015. Bisphenol A Alters Autonomic Tone and Extracellular Matrix Structure and Induces Sex-Specific Effects on Cardiovascular Function in Male and Female CD-1 Mice. *Endocrinology*, en20141847.

BIBEAU, K., OTIS, M., ST-LOUIS, J., GALLO-PAYET, N. & BROCHU, M. 2011. Differential responses to salt supplementation in adult male and female rat adrenal glands following intrauterine growth restriction. *J Endocrinol*, 209, 85-94.

BIGOT, C. & FOURNIE, A. 2011. Diagnostic du retard de croissance intra-utérin. *Université d'Angers, Ecole de Sages-Femmes*.

BROWN, N. F. 1996. Expression of a cDNA Isolated from Rat Brown Adipose Tissue and Heart Identifies the Product as the Muscle Isoform of Carnitine Palmitoyltransferase I (M-CPT I). *Journal of Biological Chemistry*, 271, 6972-6977.

BUFFAT, C., BOUBRED, F., MONDON, F., CHELBI, S. T., FEUERSTEIN, J. M., LELIEVRE-PEGORIER, M., VAIMAN, D. & SIMEONI, U. 2007. Kidney gene expression analysis in a rat model of intrauterine growth restriction reveals massive alterations of coagulation genes. *Endocrinology*, 148, 5549-57.

BYRNE, C. & PHILLIPS, D. 2000. Fetal origins of adult disease: epidemiology and mechanism. *J Clin Pathol* 53, 822-828.

CANADA, S. 2008. Tableau 102-4005 : Faible poids à la naissance (moins de 2 500 grammes), selon le sexe, Canada, provinces et territoires. Statistique Canada. 2014. *Tendances de la santé*, Produit no 82-213-XWF.

CARDIOLOGY 2013. Institut de cardiologie de l'Université d'Ottawa. http://www.ottawaheart.ca/french/nouvelles_publications/banque-de-photos-old_illustrations-medicales.htm.

CHATELAIN, F., KOHL, C., ESSERZ, V., J. MCGARRY, D., GIRARD, J. & PEGORIEK, J. 1996. Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase I gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* , 235. , 789-798.

CHEEMA, K. K., DENT, M. R., SAINI, H. K., AROUTIOUNOVA, N. & TAPPIA, P. S. 2007. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. *British Journal of Nutrition*, 93, 471.

COOK, G. A., EDWARDS, T. L., JANSEN, M. S., BAHOUTH, S. W., WILCOX, H. G. & PARK, E. A. 2001. Differential regulation of carnitine palmitoyltransferase-I gene isoforms (CPT-I alpha and CPT-I beta) in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 33, 317-29.

CORSTIUS, H. B., ZIMANYI, M. A., MAKI, N., HERATH, T., THOMAS, W., VAN DER LAARSE, A., WREFORD, N. G. & BLACK, M. J. 2005. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res*, 57, 796-800.

DOWELL, R. T. & KAUER, C. D. 1997. Maternal hemodynamics and uteroplacental blood flow throughout gestation in conscious rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 19, 613-25.

DUNN, G. A. & BALE, T. L. 2011. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology*, 152, 2228-36.

DWORATZEK, E., MAHMOODZADEH, S., SCHUBERT, C., WESTPHAL, C., LEBER, J., KUSCH, A., KARARIGAS, G., FLIEGNER, D., MOULIN, M., VENTURA-CLAPIER, R., GUSTAFSSON, J. A., DAVIDSON, M. M., DRAGUN, D. & REGITZ-ZAGROSEK, V. 2014. Sex differences in exercise-induced physiological myocardial hypertrophy are modulated by oestrogen receptor beta. *Cardiovasc Res*, 102, 418-28.

ELLIS, J. M., LI, L. O., WU, P. C., KOVES, T. R., ILKAYEVA, O., STEVENS, R. D., WATKINS, S. M., MUOIO, D. M. & COLEMAN, R. A. 2010. Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab*, 12, 53-64.

ELLIS, J. M., MENTOCK, S. M., DEPETRILLO, M. A., KOVES, T. R., SEN, S., WATKINS, S. M., MUOIO, D. M., CLINE, G. W., TAEGTMEYER, H., SHULMAN, G. I., WILLIS, M. S. & COLEMAN, R. A. 2011. Mouse cardiac acyl coenzyme a synthetase 1 deficiency impairs Fatty Acid oxidation and induces cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 31, 1252-62.

FORSÉN, T., ERIKSSON, J., TUOMILEHTO, J., OSMOND, C. & BARKER, D. 1999. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ*, 319, 1403–7.

GHOSH, P., BITSANIS, D., GHEBREMESKEL, K., CRAWFORD, M. A. & POSTON, L. 2001. Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. *J Physiol*, 533, 815-22.

GHR 2012. Genetic home reference. Cytochrome c oxidase. <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/cytochrome-c-oxidase-deficiency>.

GIACHINI, F. R., LIMA, V. V., FILGUEIRA, F. P., DORRANCE, A. M., CARVALHO, M. H., FORTES, Z. B., WEBB, R. C. & TOSTES, R. C. 2012. STIM1/Orai1 contributes to sex differences in vascular responses to calcium in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*, 122, 215-26.

HARVEY, N. C., MAHON, P. A., KIM, M., COLE, Z. A., ROBINSON, S. M., JAVAID, K., INSKIP, H. M., GODFREY, K. M., DENNISON, E. M., COOPER, C. & GROUP, S. W. S. S. 2012. Intrauterine growth and postnatal skeletal development: findings from the Southampton Women's Survey. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 26, 34-44.

HAYASHI, K., BURGHARDT, R. C., BAZER, F. W. & SPENCER, T. E. 2007. WNTs in the ovine uterus: potential regulation of perimplantation ovine conceptus development. *Endocrinology*, 148, 3496-506.

HEIJMANS, B. T., TOBI, E. W., STEIN, A. D., PUTTER, H., BLAUW, G. J., SUSSER, E. S., SLAGBOOM, P. E. & LUMEY, L. H. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17046-9.

HINDER, L., FIGUEROA-ROMERO, C., PACUT, C., HONG, Y., VIVEKANANDAN-GIRI, A., PENNATHUR, S. & FELDMAN, E. 2014. Long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 overexpression in primary cultured Schwann cells prevents long chain fatty acid-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Antioxid Redox Signal*, 1, 588-600.

HINKLE, P. C., KUMAR, M. A., RESETAR, A. & HARRIS, D. 1991. Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation *Biochemistry*, Apr 9, 3576-82.

HU, X. W., LEVY, A., HART, E. J., NOLAN, L. A., DALTON, G. R. & LEVI, A. J. 2000. Intra-uterine growth retardation results in increased cardiac arrhythmias and raised diastolic blood pressure in adult rats. *Cardiovascular Research*, 48, 233-243.

INSKIP, H. M., GODFREY, K. M., ROBINSON, S. M., LAW, C. M., BARKER, D. J., COOPER, C. & GROUP, S. W. S. S. 2006. Cohort profile: The Southampton Women's Survey. *Int J Epidemiol*, 35, 42-8.

J.-B.G. 2004. SCIENCE & VIE Hors Série. Mars.

J. DURGAN, D., K. SMITH, J., A. HOTZE, M., EGBEJIMI, O., D. CUTHBERT, K., G. ZAHA, V., R. B. DYCK, J., ABEL, E. & E. YOUNG, M. 2006. Distinct transcriptional regulation of long-chain acyl-CoA synthetase isoforms and cytosolic thioesterase 1 in the rodent heart by fatty acids and insulin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H2480-H2497.

JAMBOR DE SOUSA, U. L., KOSS, M. D., FILLIES, M., GAHL, A., SCHEEDER, M. R., CARDOSO, M. C., LEONHARDT, H., GEARY, N., LANGHANS, W. & LEONHARDT, M. 2005. CPT1alpha over-expression increases long-chain fatty acid oxidation and reduces cell viability with incremental palmitic acid concentration in 293T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 757-61.

JAMES R. WOODS, J., MARK A. PLESSINGER, KENNETH E. CLARK 1987. Effect of Cocaine on Uterine Blood Flow. *JAMA*, 257.

JOHNSON, M. & EVERITT, B. 2002. Reproduction. *De Boeck Supérieur*, 298.

KAREN A. LILLYCROP, E. S. P., ALAN A. JACKSON, MARK A. HANSON & BURDGE, A. G. C. 2005. Dietary Protein Restriction of Pregnant Rats Induces and Folic Acid Supplementation Prevents Epigenetic Modification of Hepatic Gene Expression in the Offspring. *J. Nutr*, 135, 1382-1386.

KEGG 2004. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <http://www.genome.jp/kegg/genes.html>

KELLER, H., DREYER, C., MEDIN, J., MAHFOUDI, A., OZATO, K. & WAHLI, W. 1993. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biochemistry*, 90, 2160-2164.

KERNER, J., LEE, K., TANDLER, B. & HOPPEL, C. L. 2012. VDAC proteomics: post-translation modifications. *Biochim Biophys Acta*, 1818, 1520-5.

KHAN, I. Y., TAYLOR, P. D., DEKOU, V., SEED, P. T., LAKASING, L., GRAHAM, D., DOMINICZAK, A. F., HANSON, M. A. & POSTON, L. 2002. Gender-Linked Hypertension in Offspring of Lard-Fed Pregnant Rats. *Hypertension*, 41, 168-175.

KOCH, S., VILSER, C., GROSS, W. & SCHLEUSSNER, E. 2012. Smoking during pregnancy: risk for intrauterine growth retardation and persisting microsomia. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 216, 77-81.

KWONG, W., WILD, A., ROBERTS, P., WILLIS, A. & FLEMING, T. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, 127, 4195-4202.

LAMBERS, D. S. & CLARK, K. E. 1996. The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin Perinatol*, 20, 115-26.

LEE, K., KERNER, J. & HOPPEL, C. L. 2011. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *J Biol Chem*, 286, 25655-62.

LEE, W. H. & KIM, S. G. 2010. AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists. *PPAR Res*, 2010.

LEWANDOWSKI, E. D., FISCHER, S. K., FASANO, M., BANKE, N. H., WALKER, L. A., HUQI, A., WANG, X., LOPASCHUK, G. D. & O'DONNELL, J. M. 2013. Acute liver carnitine palmitoyltransferase I overexpression recapitulates reduced palmitate oxidation of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 112, 57-65.

LI, L. O., ELLIS, J. M., PAICH, H. A., WANG, S., GONG, N., ALTSHULLER, G., THRESHER, R. J., KOVES, T. R., WATKINS, S. M., MUOIO, D. M., CLINE, G. W., SHULMAN, G. I. & COLEMAN, R. A. 2009. Liver-specific loss of long chain acyl-CoA synthetase-1 decreases triacylglycerol synthesis and beta-oxidation and alters phospholipid fatty acid composition. *J Biol Chem*, 284, 27816-26.

LI, L. O., MASHEK, D. G., AN, J., DOUGHMAN, S. D., NEWGARD, C. B. & COLEMAN, R. A. 2006. Overexpression of rat long chain acyl-coa synthetase 1 alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem*, 281, 37246-55.

LIGUORI, A., PUGLIANIELLO, A., GERMANI, D., DEODATI, A., PESCHIAROLI, E. & CIANFARANI, S. 2010. Epigenetic changes predisposing to type 2 diabetes in intrauterine growth retardation. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 1, 5.

LIM, K., ZIMANYI, M. A. & BLACK, M. J. 2006. Effect of maternal protein restriction in rats on cardiac fibrosis and capillarization in adulthood. *Pediatr Res*, 60, 83-7.

LONGO, L. D. 1977. The biological effects of carbon monoxide on the pregnant woman, fetus, and newborn infant. *Am J Obstet Gynecol*, 129, 69-103.

LOPASCHUK, G. D. & JASWAL, J. S. 2010. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56, 130-40.

LOUET, J., CHATELAIN, G., DECAUX, J., A. PARK, E., KOHL, C., PINEAU, T., GIRARD, J. & PEGORIER, J. 2001. Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase I gene (L-CPT I) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR α)-independent pathway. *Biochem. J.*, 354, 189-197.

LU, W., TU, Z., WANG, S., LU, J., WANG, Q., WANG, W., WANG, B., WANG, H., NI, H. & GUO, Y. 2013. Spatiotemporal expression of Wnt signaling pathway components during bovine placental development. *Theriogenology*, 80, 893-902.

MACLENNAN, N. K., JAMES, S. J., MELNYK, S., PIROOZI, A., JERNIGAN, S., HSU, J. L., JANKE, S. M., PHAM, T. D. & LANE, R. H. 2004. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. *Physiol Genomics*, 18, 43-50.

MADIRAJU S., R. M., SHRI V. PANDE 1987. Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Biochemistry*, 84, 378-382.

MAHMOODZADEH, S., FLIEGNER, D. & DWORATZEK, E. 2012. Sex differences in animal models for cardiovascular diseases and the role of estrogen. *Handb Exp Pharmacol*, 23-48.

MARIEB, E. & HOEHN, K. 2010. Anatomie et physiologie humaine. 4e édition. *ERPI*, 1293.
MARTEL, C., WANG, Z. & BRENNER, C. 2014. VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate. *Mitochondrion*.

MASHEK, D. G., BORNFELDT, K. E., COLEMAN, R. A., BERGER, J., BERNLOHR, D. A., BLACK, P., DIRUSSO, C. C., FARBER, S. A., GUO, W., HASHIMOTO, N., KHODIYAR, V., KUYPERS, F. A., MALTAIS, L. J., NEBERT, D. W., RENIERI, A., SCHAFFER, J. E., STAHL, A., WATKINS, P. A., VASILIOU, V. & YAMAMOTO, T. T. 2004. Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *J Lipid Res*, 45, 1958-61.

MENENDEZ-CASTRO, C., FAHLBUSCH, F., CORDASIC, N., AMANN, K., MUNZEL, K., PLANK, C., WACHTVEITL, R., RASCHER, W., HILGERS, K. F. & HARTNER, A. 2011. Early and late postnatal myocardial and vascular changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction. *PLoS One*, 6, e20369.

MENENDEZ-CASTRO, C., TOKA, O., FAHLBUSCH, F., CORDASIC, N., WACHTVEITL, R., HILGERS, K. F., RASCHER, W. & HARTNER, A. 2014. Impaired myocardial performance in a normotensive rat model of intrauterine growth restriction. *Pediatr Res*, 75, 697-706.

MORIN, A. 2003. <http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/Notes/Metabolisme.htm#998236>.
Professeur et directeur. Département de biologie, Université d'Ottawa.

OJEDA, N. B., GRIGORE, D. & ALEXANDER, B. T. 2008. Role of fetal programming in the development of hypertension. *Future Cardiol*, 4, 163-74.

OKAMOTO, K. & SHAW, J. M. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 503-538.

ONODERA, T., TAMURA, T., SAID, S., MCCUNE, S. A. & GERDES, A. M. 1998. Maladaptive remodeling of cardiac myocyte shape begins long before failure in hypertension. *Hypertension*, 32, 753-757.

PAINTER, R. C., DE ROOIJ, S. R., BOSSUYT, P. M., SIMMERS, T. A., OSMOND, C., BARKER, D. J., BLEKER, O. P. & ROSEBOOM, T. J. 2006. Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr*, 84, 322-7.

PARK, E., MYNATT, R., COOK, G. & KASHFITT, K. 1995. Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase-1. *Biochem. J.*, 310, 853-858.

PATERGNANI, S., SUSKI, J. M., AGNOLETTI, C., BONONI, A., BONORA, M., DE MARCHI, E., GIORGI, C., MARCHI, S., MISSIROLI, S., POLETTI, F., RIMESSI, A., DUSZYNSKI, J., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. 2011. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal*, 9, 19.

POWELL, T., MATSUOKA, S., SARAI, N. & NOMA, A. 2004. Intracellular Ca²⁺ dynamics and sarcomere length in single ventricular myocytes. *Cell Calcium*, 35, 535-42.

PRIP-BUUS, C., PEGORIER, J.-P., DUEE, P.-H., KOHL, C. & GIRARD, J. 1990. Evidence that the sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to inhibition by malonyl-CoA is an important site of regulation of hepatic fatty acid oxidation in the fetal and newborn rabbit. *Biochem. J.*, 269, 409-415.

REAMON-BUETTNER, S. M., BUSCHMANN, J. & LEWIN, G. 2014. Identifying placental epigenetic alterations in an intrauterine growth restriction (IUGR) rat model induced by gestational protein deficiency. *Reprod Toxicol*, 45, 117-24.

RIZZUTO, R., DE STEFANI, D., RAFFAELLO, A. & MAMMUCARI, C. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 566-78.

ROY-CLAVEL, E., PICARD, S., ST-LOUIS, J. & BROCHU, M. 1999. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol*, 180, 608-13.

RUEDA-CLAUSEN, C. F., MORTON, J. S. & DAVIDGE, S. T. 2009. Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood. *Cardiovasc Res*, 81, 713-22.

S. GOLFMAN, L., R. WILSON, C., SHARMA, S., BURGMAIER, M., E. YOUNG, M., H. GUTHRIE, P., VAN ARSDALL, M., V. ADROGUE, J., K. BROWN, K. & TAEGTMEYER, H. 2005. Activation of PPAR γ enhances myocardial glucose oxidation and improves contractile function in isolated working hearts of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289.

SALAS, S. P., ROSSO, P., ESPINOZA, R., ROBERT, J. A., VALDES, G. & DONOSO, E. 1993. Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation. *Obstet Gynecol*, 81, 1029-33.

SHARPE, R. M. & FRANKS, S. 2002. Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue. *Nat Cell Biol*, 4 Suppl, s33-40.

SHOSHAN-BARMATZ, V., ISRAELSON, A., BRDICZKA, D. & SHEU, S. S. 2006. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des*, 12, 2249-70.

SILVERTHORN, D. 2007. Physiologie humaine : Une approche intégrée. 4e édition. . *Pearson Education France*, 936.

SON, N., PARK, T., YAMASHITA, H., YOKOYAMA, M., A. HUGGINS, L., OKAJIMA, K., HOMMA, S., J. SZABOLCS, M., HUANG, L. & J. GOLDBERG, I. 2007. Cardiomyocyte expression of PPAR γ leads to cardiac dysfunction in mice. *J. Clin. Invest.*, 117, 2791-2801.

SONDEREGGER, S., POLLHEIMER, J. & KNOFLER, M. 2010. Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review. *Placenta*, 31, 839-47.

ST-LOUIS, J., SICOTTE, B., BEAUSEJOUR, A. & BROCHU, M. 2006. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction*, 131, 331-9.

T. OZAKI, H. N., M. A. HANSON AND L. POSTON 2001. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *Journal of Physiology*, 530.1, 141-152.

TORTORA, G. & GRABOWSKI, S. 1993. Principles of Anatomy and Physiology.

UNTERBERGER, A., SZYF, M., NATHANIELSZ, P. W. & COX, L. A. 2009. Organ and gestational age effects of maternal nutrient restriction on global methylation in fetal baboons. *J Med Primatol*, 38, 219-27.

VARGA, T., CZIMMERER, Z. & NAGY, L. 2011. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 1007-22.

VIKRAMADITHYAN, R. K., HIRATA, K., YAGYU, H., HU, Y., AUGUSTUS, A., HOMMA, S. & GOLDBERG, I. J. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists modulate heart function in transgenic mice with lipotoxic cardiomyopathy. *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 586-93.

VILLAR, I. C., HOBBS, A. J. & AHLUWALIA, A. 2008. Sex differences in vascular function: implication of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *J Endocrinol*, 197, 447-62.

WALSH, C., BARROW, S., VORONINA, S., CHVANOV, M., PETERSEN, O. H. & TEPIKIN, A. 2009. Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1374-82.

WEISTHAL, S., KEINAN, N., BEN-HAIL, D., ARIF, T. & SHOSHAN-BARMATZ, V. 2014. Ca(2+)-mediated regulation of VDAC1 expression levels is associated with cell death induction. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2270-81.

WOLDEGIORGIS, G., DAI, J. & ARVIDSON, D. 2005. Structure-Function Studies with the Mitochondrial Carnitine Palmitoyltransferases I and II. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 136, 1325-1340.

WU, G., W. BAZER, F., A. CUDD, T., J. MEININGER, C. & E. SPENCER, T. 2004. Maternal Nutrition and Fetal Development. *American Society for Nutritional Sciences.*, 0022-3166/04, 2169-2172.

YAMAMOTO, T., YAMADA, A., WATANABE, M., YOSHIMURA, Y., YAMAZAKI, N., YOSHIMURA, Y., YAMAUCHI, T., KATAOKA, M., NAGATA, T., TERADA, H. & SHINOHARA, Y. 2006. VDAC1, Having a Shorter N-Terminus Than VDAC2 but Showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. *Journal of Proteome Research*, 5, 3336-3344.

YANG, Y., OUYANG, Y., YANG, L., BEAL, M. F., MCQUIBBAN, A., VOGEL, H. & LU, B. 2008. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7070-5.

YU, T., ROBOTHAM, J. L. & YOON, Y. 2006. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2653-8.

ZHENG, S., ROLLET, M. & PAN, Y. X. 2011. Maternal protein restriction during pregnancy induces CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBPbeta) expression through the regulation of histone modification at its promoter region in female offspring rat skeletal muscle. *Epigenetics*, 6, 161-70.