

Université de Montréal

Métabolisme énergétique cardiaque fœtal dans un modèle de
restriction de croissance intra-utérine chez le rat

Par

Sarah Monfils

Programme de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Février 2011

©Sarah Monfils, 2010

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Métabolisme énergétique cardiaque fœtal dans un modèle de
restriction de croissance intra-utérine chez le rat

Présenté par:

Sarah Monfils

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Guy Rousseau:
Dre Michèle Brochu:
Dr Yann Burelle:

Président-rapporteur
Directrice de recherche
Membre du jury

RÉSUMÉ

Une diète faible en sodium donnée à des rates lors de la dernière semaine de gestation induit une diminution de l'expansion volumique, du diamètre des artères utérines et du poids des placentas comparativement à des rates témoins. Ces perturbations suggèrent une diminution de la perfusion placentaire affectant l'apport fœtal en nutriments. Les rats naissent avec une restriction de croissance intra-utérine (RCIU). Chez le fœtus, le substrat énergétique cardiaque principal est le glucose via la glycolyse. À la naissance, la source principale d'énergie est l'utilisation des acides gras par la β -oxydation. Nous émettons l'hypothèse que dans ce modèle de RCIU, le cœur fœtal répond à la diminution d'apport nutritionnel due à une atteinte maternelle en adaptant son métabolisme énergétique cardiaque à la baisse. Les rates gestantes (témoins et recevant la diète faible en sodium) sont sacrifiées au jour 22 de gestation (sur 23). Les cœurs fœtaux sont prélevés afin de caractériser les protéines dites « limitantes » *in vitro* des voies de la glycolyse et de la β -oxydation. Les expressions protéiques de GLUT1, GLUT4, HK1, HK2, CPT2, CPT1 β , cytochrome c, PFK1, PKM1/2, mesurées par immunobuvardage de type Western, sont similaires entre les cœurs des fœtus RCIU et témoins, mâles et femelles. L'expression protéique de CPT1 α est diminuée dans les cœurs des femelles RCIU seulement. Il n'existe aucune différence significative entre les différents groupes quant à l'activité enzymatique de PKM1/2. Nos résultats dressent un profil métabolique général suggérant que le sexe du fœtus peut avoir un effet sur la réponse cardiaque fœtale à une atteinte du volume sanguin maternel causée par la diète restreinte en sodium. Ce profil métabolique semble démontrer une atteinte du catabolisme des lipides. Afin de bien caractériser cette réponse du mécanisme énergétique, l'activité enzymatique des autres enzymes principales de la glycolyse (HK1, HK2, PFK1), le flux intra-mitochondrial d'acyl CoA à travers les CPTs ainsi que la quantité totale d'acétyl CoA devront être quantifiés.

Mots Clés : restriction de croissance intra-utérine, glycolyse, β -oxydation des acides gras, cœur fœtal, apoptose.

ABSTRACT

A low sodium diet was given to pregnant rats during the last week of gestation. This diet diminished the maternal expansion of blood volume, the uterine arteries diameter, and placental weight, when compared to their controls. Together, these results suggest a lower placenta perfusion and a decreased output of nutrients to the fetus. The offspring of these pregnant rats were born with an intra-uterine growth retardation (IUGR). The fetal heart utilizes glucose through glycolysis as the major cardiac energy substrate. At birth, the principal source of energy switches to the oxidation of fatty acids, through β -oxydation. We hypothesized that within our IUGR model, the fetal heart could respond to a diminished nutritional intake due to the maternal input when a decreased cardiac energy metabolism was present. The pregnant rats of both groups (controls and on the low sodium diet) were sacrificed on day 22 of a 23 day gestation. The fetal hearts were then analyzed looking for signs of the limiting proteins glycolysis and β -oxydation. The GLUT1, GLUT4, HK1, HK2, CPT2, CPT1 β , cytochrome c, PFK1, PKM1/2 proteins obtained through a Western immunoblot method were similar between the hearts of the IUGR and their control fetuses, whether they were male or female. The protein expression of CPT1 α was lower only in female IUGR fetal hearts. There was no significant difference between the groups with respect to the enzymatic activity of PKM1/2. Our results suggest that the metabolic profile changes with regards to the fetus gender and could affect the fetal cardiac metabolism, due to a lower maternal blood flow caused by a sodium controlled diet, by diminishing its lipid metabolism and sparing glucose metabolism. To characterize the energy metabolism, the enzymatic activity of the other principal limiting enzymes glycolysis (HK1, HK2, PFK1), the intra-mitochondrial flux of acyl CoA through the CPTs and the total quantity of acetyl CoA must also be analyzed.

Key words: intra-uterine growth retardation, glycolysis, fatty acid β -oxydation, fetal heart, apoptosis.

TABLE DES MATIÈRES

Page de présentation du mémoire.....	i
Page de présentation du jury.....	ii
Résumé et mots-clés.....	iii
Abstract and key words.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Restriction de Croissance Intra-Utérine.....	3
1.1.1 Paramètres de la Restriction de croissance Intra-Utérine.....	3
1.1.2 Théorie de programmation fœtale.....	5
1.1.3 Modèles de Restriction de croissance Intra-Utérine.....	6
1.1.3.1 Différents modèles.....	6
1.1.3.2 Le modèle RCIU développé au laboratoire.....	9
1.2 Le placenta.....	14
1.2.1 Organogenèse et morphologie générale.....	14
1.2.2 Transfert de nutriments et autres fonctions.....	14
1.3 Le cœur.....	16
1.3.1 Organogenèse.....	16
1.3.2 Histologie.....	18
1.3.3 Substrats énergétiques.....	19
1.4 Métabolisme énergétique cardiaque.....	23
1.4.1 Glycolyse.....	24
1.4.1.1 Transport membranaire du glucose.....	25
1.4.1.2 Glycolyse.....	28
1.4.1.3 Étapes limitantes de la glycolyse, contrôle et régulation.....	29
a) Hexokinase.....	30
b) Phosphofructokinase.....	32
c) Pyruvate Kinase.....	33

1.4.1.4	Catabolisme du pyruvate dans la mitochondrie.....	33
1.4.2	β -oxydation des acides gras.....	34
1.4.2.1	Transport membranaire des acides gras.....	36
1.4.2.2	Transport mitochondrial de l'acyl CoA à longue chaîne ...	37
1.4.2.3	β -oxydation intra-mitochondriale.....	39
1.4.3	Cycle de Krebs et Phosphorylation oxydative.....	41
1.5	Insuffisance cardiaque et cardiomyopathie.....	45
1.6	Mort cellulaire.....	48
	a) Apoptose.....	48
	b) Nécrose.....	51
1.7	Hypothèse de travail et objectifs.....	52
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	55
2.1	Animaux et protocole d'étude.....	56
2.2	Extraction des protéines.....	56
2.3	Dosage des protéines.....	57
2.4	Immunobuvardage de type Western.....	57
2.5	Activité enzymatique de la Pyruvate Kinase.....	62
2.6	Analyses statistiques.....	64
3.	RÉSULTATS.....	65
3.1	Métabolisme énergétique cardiaque des glucides.....	66
3.1.1	Expression protéique du transport du glucose et des enzymes... limitantes	66
3.1.2	Activité enzymatique de la Pyruvate Kinase.....	69
3.2	Métabolisme énergétique cardiaque des acides gras..... Transport intra-mitochondrial	71
3.3	Métabolisme énergétique cardiaque..... Chaîne mitochondriale de transport d'électrons	73
3.4	Mort cellulaire : Apoptose.....	75
4.	DISCUSSION.....	80
5.	BIBLIOGRAPHIE.....	93
6.	ANNEXE I.....	109
7.	REMERCIEMENTS.....	111

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Comparaison des changements hémodynamiques qui surviennent lors de la grossesse humaine et de la gestation d'une rate.....	10
Figure 2.	Régions principales et différents types cellulaires du placenta à terme.....	12
Figure 3.	Substrats énergétiques en période périnatale chez le rat.....	20
Figure 4.	Vue d'ensemble du métabolisme énergétique cardiaque.....	24
Figure 5.	Transport membranaire du glucose cardiaque.....	27
Figure 6.	Voie de la glycolyse.....	29
Figure 7.	Transport membranaire des acides gras et des TAG et formation d'acyl CoA intracellulaire.....	37
Figure 8.	Transport des LCFA du cytosol vers l'intérieur de la mitochondrie par le système CPT1-CACT-CPT2.....	38
Figure 9.	Schéma de la β -oxydation des acides gras.....	40
Figure 10.	Vue d'ensemble du cycle de Krebs.....	42
Figure 11.	Chimiosmose entre la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative.....	44
Figure 12.	Voie intrinsèque de l'apoptose induite par une atteinte maternelle.....	50
Figure 13.	Expression protéique des transporteurs membranaires de glucose GLUT1 et GLUT4 dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU.....	66
Figure 14.	Expression protéique des enzymes limitantes déterminantes de la voie métabolique de la glycolyse, dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU.....	68
Figure 15.	Activité enzymatique de la pyruvate kinase dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU.....	70

Figure 16.	Expression protéique des CPTs, principaux déterminants de la β -oxydation des acides gras, dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU.....	72
Figure 17.	Expression protéique du cytochrome c dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU.....	74
Figure 18.	Expression protéique de Bax et Bcl-2 dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU.....	76
Figure 19.	Expression protéique de la caspase 3 clivée et non-clivée dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Protéines cibles et coactivateurs de PPAR α	35
Tableau 2	Bilan global de production énergétique selon le substrat utilisé.....	45
Tableau 3	Paramètres et conditions optimaux pour la réalisation d'électrophorèse et immunobuvardage de type Western des divers protéines d'intérêt.....	61
Tableau 4	Composition de la réaction pour la mesure de l'activité de la pyruvate kinase selon le protocole du fabricant Biovision.....	63
Tableau 5	Tableau récapitulatif des résultats des analyses statistiques par immunobuvardage de type Western.....	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

11 β -HSD2 : 11bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase type 2

ACO : acyl CoA oxydase

ADN : acide désoxyribonucléique

AD : acyl déshydrogénase

ADP : adénosine diphosphate

AIF : facteur d'induction de l'apoptose (*apoptosis inducing factor*)

Akt : sérine/thréonine protéine kinase spécifique

AMP : adénosine monophosphate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AMPK : adénosine monophosphate kinase

Ang II : angiotensine II

ANOVA : analyse factorielle de variance

ANP : peptide natriurétique auriculaire (*atrial natriuretic peptide*)

Apaf-1 : facteur 1 activateur de peptidases apoptotiques (*apoptotic peptidase activating factor 1*)

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

AV : auriculo-ventriculaire

Bad : promoteur de mort associée avec Bcl-2 (*Bcl-2-death associated promoter*)

Bak : antagoniste tueur homologue à Bcl-2 (*Bcl-2 homologous antagonist killer*)

Bax : protéine X associée à Bcl-2 (*Bcl-2-associated X protein*)

Bcl-2 : lymphome 2 des cellules B (*B-cell lymphoma 2*)

Bcl-xL : protéine Bcl-2-like 1, protéine Bcl-Xlong

Bid : agoniste avec domaine de mort interagissant avec BH3 (*BH3 interacting domain death agonist*)

tBid : Bid tronqué

Bik : molécule meurtrière interagissant avec Bcl-2 (*Bcl-2-interacting killer*)

Bim : médiateur de mort cellulaire interagissant avec Bcl-2 (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*)

Blk : kinase de la famille des src (coactivateur du récepteur des stéroïdes) spécifique aux cellules b (*b-cell specific src (steroid receptor coactivator)-family kinase*)

Ca²⁺ : ion calcium

CACT : translocase de carnitine-acylcarnitine (*carnitine-acylcarnitine translocase*)

CAMKIII : calmoduline kinase de type III

CBP : protéine de liaison interagissant avec CREB (protéine élément de réponse se liant avec AMPc) (*CREB (cAMP-response element-binding protein) binding protein*)

CO₂ : dioxyde de carbone

CoA : coenzyme A

Cox-2 : cyclooxygénase-2

CPT1 : carnitine palmitoyl transférase 1

CPT1 α : carnitine palmitoyl transférase 1 alpha

CPT1 β : carnitine palmitoyl transférase 1 bêta

CPT2 : carnitine palmitoyl transférase 2

CRH : corticolibérine

DED : domaine effecteur de mort (*death effector domain*)

EH : énoyl-CoA hydratase

ERK : kinase régulée par des signaux extracellulaires (*extracellular signal-regulated kinase*)

F-6-P : fructose-6-phosphate

FABP : protéine de liaison aux acides gras (*fatty acid binding protein*)

FAD : dinucléotide adénine flavine (*flavin adenine dinucleotide*)

FADD : domaine de mort associé à Fas (*Fas associated death domain*)

FADH₂ : forme hydroquinone de FAD

FARE-1 : élément de réponse 1 aux acides gras (*fatty acid response element-1*)

Fas : fragment stimulant l'apoptose (*apoptosis stimulating fragment*)

FAT/CD36 : transporteur des acides gras/cluster de différenciation type 36 (*fatty acid transporter/cluster of differentiation type 36*)

FATP : protéine de transport des acides gras (*fatty acid transporter protein*)

FATP6 : protéine de transport des acides gras de type 6 (*fatty acid transporter protein type 6*)

Fe-S : protéine contenant du soufre et du fer fermement liés

FGF : facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor*)

FGF2 : facteur de croissance des fibroblastes 2 (*fibroblast growth factor 2*)

FGFR1 : récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (*fibroblast growth factor receptor 1*)

FMN : flavine mononucléide

G-6-P : glucose-6-phosphate

GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GLUT : transporteur de glucose (*glucose transporter*)

GLUT1 : transporteur de glucose de type 1

GLUT4 : transporteur de glucose de type 4

GTP : guanosine triphosphate

H⁺ : ion hydrogène

H₂O : molécule d'eau

H₂O₂ : molécule de peroxyde d'oxygène

HAD : 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase

HIF1 : facteur 1 inductible par l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor 1*)

- HIF1 α** : facteur 1 alpha inductible par l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor 1 alpha*)
- HIF1 β** : facteur 1 bêta inductible par l'hypoxie (*hypoxia-inducible factor 1 beta*)
- HK** : hexokinase
- HK1** : hexokinase de type 1
- HK2** : hexokinase de type 2
- IGF** : facteur de croissance semblable à l'insuline, somatomédine (*insulin-like growth factor*)
- IRS1-2** : signaux 1-2 du récepteur à l'insuline (*insulin receptor signal 1-2*)
- K⁺** : ion potassique
- kDa** : kilodalton
- KO** : knock-out (*knock-out*)
- KT** : β -cétoacyl-CoA thiolase
- LCFA** : acide gras à longue chaîne hydrocarbonée (*long chain fatty acid*)
- LCAD** : déshydrogénase pour les acyl à longue chaîne hydrocarbonée
- LCAS** : acyl CoA à longue chaîne synthétase
- LCEH** : énoyl-CoA hydratase pour les acides gras à longue chaîne hydrocarbonée
- LCHAD** : 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase pour les acides gras à longue chaîne hydrocarbonée
- LCKT** : β -cétoacyl-CoA thiolase pour les acides gras à longue chaîne hydrocarbonée
- LPD** : diète faible en protéines (*low protein diet*)
- MAPK** : protéine kinase au facteur activé mitogène (*mitogen-activated protein kinase*)
- MCAD** : déshydrogénase pour les acyl à moyenne chaîne hydrocarbonée
- MCFA** : acide gras à moyenne chaîne hydrocarbonée (*medium chain fatty acid*)
- MEF2** : facteur 2 d'amplification des myocytes (*myocyte enhancer factor 2*)
- Mg²⁺** : ion magnésium
- Mn²⁺** : ion manganèse

MTE-1 : thioestérase mitochondriale 1 (*mitochondrial thioesterase-1*)

MTP : complexe protéique octamérique trifonctionnelle mitochondriale (*mitochondrial trifunctionnal proteins*)

Na⁺ : ion sodium

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit

Na⁺/K⁺ ATPase : pompe sodium-potassium dépendante de l'ATP

NRRE-1 : éléments de réponse 1 au récepteur nucléaire (*nuclear receptor response elements-1*)

O₂ : molécule d'oxygène

PBP : protéine de liaison à la préséniline (*presenilin-binding protein*)

PBST : tampon saline phosphate auquel du Tween 20 a été ajouté (*phosphate buffered saline with tween 20*)

PDH : pyruvate déshydrogénase

PDK : pyruvate déshydrogénase kinase

PDK4 : pyruvate déshydrogénase kinase 4

PEP : phosphoénolpyruvate

PFK : phosphofructokinase

PFK1 : phosphofructokinase de type 1

PFK2 : phosphofructokinase de type 2

PGC-1 : coactivateur 1 du récepteur au facteur activé de prolifération des peroxyosomes (*peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1*)

PGK1 : phosphoglycérate kinase 1

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PK : pyruvate kinase

PKA : protéine kinase de type A

PKB : protéine kinase de type B

PKC : protéine kinase de type C

PKM1/2 : isoformes M1 et M2 de la pyruvate kinase

PPAR α : récepteur alpha au facteur activé de prolifération des peroxysomes
(*peroxysome proliferator-activated receptor alpha*)

PPAR β : récepteur beta au facteur activé de prolifération des peroxysomes
(*peroxisome proliferator-activated receptor beta*)

PPAR δ : récepteur delta au facteur activé de prolifération des peroxysomes
(*peroxisome proliferator-activated receptor delta*)

PPP : voie des pentoses phosphate (*pentose phosphate pathway*)

PPRE : élément de réponse de la prolifération des peroxysomes (*peroxisome proliferator responsive elements*)

PTP : pore transitoire de perméabilité

RAAS : système rénine-angiotensine-aldostérone (*renin-angiotensin-aldosterone system*)

RCIU : restriction de croissance intra-utérine

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

RXR : récepteur rétinoloïde X (*retinoid X receptor*)

SCAD : déshydrogénase pour les acyl à courte chaîne hydrocarbonée

SCFA : acide gras à courte chaîne hydrocarbonée (*short chain fatty acid*)

SEM : erreur type de la moyenne (*standard error mean*)

SGLT : protéine de transport sodium-glucose (*sodium-glucose transport protein*)

SGLT1 : protéine de transport sodium-glucose 1 (*sodium-glucose transport protein 1*)

SRC-1 : coactivateur 1 du récepteur stéroïdien (*steroid receptor coactivator-1*)

TAG : triglycéride, triacylglycérol, triacylglycéride

TGF- β 1 : facteur beta 1 de croissance mitogène (*transforming growth factor beta-1*)

TIM : triose phosphate isomérase

TPP : thiamine pyrophosphate

TRAP220 : protéine associée à l'hormone thyroïdienne (*thyroid hormone associated protein 220*)

UCP : protéine de découplage (*uncoupling protein*)

UCP2 : protéine de découplage 2 (*uncoupling protein 2*)

UCP3 : protéine de découplage 3 (*uncoupling protein 3*)

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelium growth factor*)

VLCAD : déshydrogénase pour les acyl coenzymes A à très longue chaîne (*very long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase*)

VLCFA : acide gras à très longue chaîne hydrocarbonée (*very long chain fatty acid*)

VLDL : lipoprotéines de très faible densité (*very low density lipoproteins*)

VO₂ : Volume d'oxygène consommé

Wnts : acronyme de *wingless* (sans aile) et *int1*

1. INTRODUCTION

La restriction de croissance intra-utérine (RCIU) représente la cause de mortalité et morbidité prénatale la plus importante en touchant 7-15% des naissances^{9,16,51}. Il a été démontré que les individus nés avec une RCIU présentent une plus grande prévalence au développement de conditions pathologiques à l'âge adulte dont la dyslipidémie, le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, les maladies coronariennes et cardiaques^{24 92 166 90 199 269}. Malgré sa grande prévalence et son implication importante en tant que cause pathologique, il existe peu de connaissances à ce jour abordant l'impact de la RCIU sur le développement fœtal. Afin d'élucider ce dernier, notre laboratoire a élaboré un modèle de RCIU en donnant une diète faible en sodium lors de la dernière semaine de gestation à des rates gestantes. La diète a pour effet d'empêcher l'expansion volumique sanguine maternelle normale. Ceci provoque une baisse de perfusion placentaire et d'apport fœtal en nutriments. Cette diminution d'apport nutritionnel au fœtus peut affecter conséquemment l'homéostasie et le développement fœtal normal. De plus, les femelles du modèle développé au laboratoire développent à l'âge adulte un remodelage cardiaque. Ce dernier est caractérisé par une hypertrophie liée à une augmentation de la largeur et du volume des cardiomyocytes, une augmentation de la longueur des sarcomères, une diminution de la contractilité des cardiomyocytes et une plus faible activité de l'aconitase³¹

Cette étude permettra de connaître les effets *in utero* d'une RCIU sur le métabolisme énergétique cardiaque fœtal et de mieux comprendre ses conséquences pathologiques à long terme. L'action du cœur, chez les organismes pluricellulaires, entraîne la propulsion de nutriments et d'oxygène aux tissus qui les composent. Le métabolisme énergétique cardiaque, à travers l'utilisation du glucose par la glycolyse et des acides gras par la β -oxydation, est en étroite relation avec la fonction cardiaque de contraction/expulsion. Cette dernière est primordiale au bon développement fœtal. Une altération du développement fœtal peut avoir des conséquences à long terme sur cet organe et l'ensemble de l'organisme via un changement de la fonction cardiaque.

La revue de la littérature est divisée en trois volets. Dans le premier volet sera abordé la grossesse et la RCIU en tant que complication de cette dernière. Le rôle du placenta ainsi que le transfert des nutriments maternels au fœtus seront également abordés. Le second volet introduira les connaissances actuelles en termes de développement, maturation et métabolisme énergétique cardiaques. Pour terminer, le troisième volet décrira les conditions pathologiques et les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire. La mort cellulaire est essentielle dans le processus de maturation cardiaque. Elle constitue également une conséquence possible à un métabolisme énergétique cardiaque altéré et fonctionnant inadéquatement.

1.1 Restriction de Croissance Intra-Utérine

La RCIU est une complication de grossesse provoquant des conséquences immédiates sur le fœtus et pouvant avoir des répercussions à long terme. À la suite d'une RCIU, les nouveau-nés chez le rat et l'Homme sont hypotrophes et souvent hypoglycémiques¹⁰⁸
^{70 149 89}. La majorité des enfants RCIU montrent un rattrapage dans les 2 premières années de vie et atteignent une stature finale dans la normale en accord avec leur grandeur mi-parentale⁵⁸. Par contre, entre 10 et 40% de ces enfants RCIU n'y parviennent pas^{58 112}.

1.1.1 Paramètres de la Restriction de Croissance Intra-Utérine

La RCIU peut être de type symétrique (proportionnelle) ou de type asymétrique (disproportionnelle):

- A) Le premier cas correspond à une grossesse à terme avec un enfant hypotrophe, présentant une taille, un poids et un périmètre crânien réduits (microcéphalie) de façon symétrique (proportionnel) associé à des problèmes psychomoteurs majeurs. Ces RCIU peuvent être causées par des facteurs génétiques (trisomie 13 et 18, 21), toxiques (alcool, tabagisme, toxicomanie), médicamenteux

(antiépileptiques, hydantoïdes, immunosuppresseurs, corticoïdes) et infectieux (rubéole, toxoplasmose, syphilis, parvovirus, entérovirus, herpès, varicelle).

- B) La RCIU disproportionnelle est associée à une redistribution du flot sanguin fœtal au profit du cœur et du cerveau, au détriment des reins. Ceci a pour conséquence d'augmenter les ratios cerveau:poids total et cœur:poids total sans affecter le ratio rein:poids total. Les causes probables de ce type de RCIU sont souvent de nature pathologiques placentaires (lésion/atteinte/réduction) affectant les échanges fœto-maternels. Ces causes comprennent un syndrome vasculo-rénal primaire ou secondaire (à une hypertension, un lupus, un diabète ou une néphropathie chronique préalable), une grossesse gémellaire (monozygote et dizygote), des anomalies et insuffisances placentaires (infarctus, chorioangiome, pathologie dysimmunitaire, insertion vélamenteuse, nœuds). Ces RCIU peuvent aussi être causées par une malnutrition maternelle chronique ou une hypoxie chronique (anémie maternelle chronique, haute altitude, cardiopathie maternelle) ^{71 20 151 140}.

Des conditions de croissance inadéquates fœtales telles qu'une malnutrition maternelle, un espace utérin restreint, ou une perfusion placentaire réduite, limitent la croissance fœtale et résultent en un état hypotrophe sous le 10^e percentile (sous le 3^e percentile pour une RCIU sévère) ^{231 89 51}. Parmi toutes les causes possibles de RCIU, 30% sont de cause idiopathique ²³¹. Lors d'une RCIU provoquée par une insuffisance placentaire, le rythme cardiaque fœtal diminue: c'est la décélération tardive. À ce jour, les recherches ne peuvent établir si cette décélération est une cause ou une conséquence de la RCIU ^{197 117}. L'apport en acides aminés transférés au fœtus est significativement réduit dans les premières étapes de la RCIU indépendamment de la sévérité de cette dernière et de la présence ou non d'hypoxie. Elle est accompagnée d'une diminution de l'activité des transporteurs d'acides aminés placentaires du système A et du transporteur de leucine et taurine dans la membrane plasmique des syncytiotrophoblastes. Cette diminution est associée à un catabolisme protéique fœtal

proportionnellement augmenté^{152 149 121 177}. Une augmentation de la consommation de glucose par le placenta lors d'une RCIU avec insuffisance placentaire perturbe le transfert glucidique à travers cette barrière fœto-maternelle¹⁴⁹. Les concentrations sanguines fœtales de glucose sont donc basses. Des études dans des modèles animaux (brebis et rat) de RCIU montrent des augmentations de néoglucogenèse fœtale pouvant agir à titre de processus compensatoire à cette baisse glucidique fœtale^{143 93}. Les récepteurs aux lipoprotéines et les lipoprotéines lipases placentaires sont réduits lors d'une RCIU. Ces altérations abaissent le transfert des acides gras au fœtus^{150 226 253 95}. L'apport nutritionnel fœtal est donc diminué lors d'une RCIU induite par une insuffisance placentaire.

La perfusion materno-fœtale diminuée par une insuffisance placentaire affecte l'apport en nutriments et en oxygène au fœtus. Les atteintes du flot sanguin fœtal et de l'apport en oxygène dépendent du type de restriction (hypoxie, asphyxie) et de la cause de la réduction du flot ombilical et placentaire (compression de la veine ombilicale, compression de l'aorte abdominale fœtale, blocage du cordon ombilical, embolisation du lit vasculaire placentaire, anémie, prééclampsie, maladies du cœur, du rein et des poumons, hémoglobinopathie)^{269 123}. Par contre, la consommation fœtale d'oxygène est assez constante. En effet, elle demeure stable sur un grand éventail de perturbations de la circulation ombilicale et placentaire. Ceci est dû à la centralisation métabolique sanguine. Par ce phénomène, le corps redistribue le flot sanguin des périphéries vers le centre de l'organisme. Le même phénomène se produit dans le cerveau adulte lorsqu'il concentre son flot sanguin vers les noyaux centraux et les ventricules aux dépens de ses périphéries lors d'une perturbation de la circulation sanguine cérébrale¹²³.

1.1.2 Théorie de programmation fœtale

La théorie de programmation fœtale décrit le processus par lequel un stimulus ou une atteinte à une période critique de développement aura des effets et répercussions à

long terme durant toute la vie de l'individu touché ^{24 246 212 199 136}. Durant cette période critique, le système est flexible (plasticité) et sensible à l'environnement ^{24 246 212 199 136}. Les réponses immédiates à la sous-alimentation intra-utérine sont de natures cataboliques: le fœtus consomme ses propres substrats pour obtenir une source d'énergie. La survie fœtale dans de telles conditions est dépendante de la diminution d'utilisation de ses substrats et de leur métabolisme, accompagnée d'une réduction de ses dépenses métaboliques ²⁴. Dû à son adaptation *in utero*, un organe peut être vulnérable sans qu'une anomalie ne soit décelée à la naissance. Cependant, suite à un stress plus tard dans la vie, les capacités d'adaptation de cet individu s'avèrent diminuées ^{136 230 269}. Une croissance fœtale inadéquate et un petit poids corporel à la naissance sont associés avec une augmentation du risque de mort par des maladies adultes cardiaques ischémiques et coronariennes. De plus, ils sont également associés à une plus grande prévalence du syndrome de résistance à l'insuline ou syndrome métabolique (tolérance au glucose, hypertension, augmentation du taux de triglycérides sérique, insulino-résistants, hyperinsulinémie) ^{24 92 90 199 269}.

1.1.3 Modèles de Restriction de croissance Intra-Utérine

Plusieurs modèles animaux ont été élaborés dans l'optique de comprendre les mécanismes conduisant à une RCIU. Ils diffèrent entre eux par leur méthode d'induction de la RCIU.

1.1.3.1 Différents modèles

Lors d'une injection excessive de glucocorticoïdes à des femelles brebis gestantes, le poids des cardiomyocytes fœtaux ventriculaires est augmenté. Toutefois, il n'y a pas de changement ni de la taille ni de l'état de maturation ni de la binucléation de ces cellules. Les glucocorticoïdes affectent d'ailleurs le cycle cellulaire de ces cardiomyocytes en stimulant leur réplication, ce qui provoque une augmentation du nombre de cellules cardiaques post-traitement ¹⁰⁰. L'exposition excessive aux glucocorticoïdes *in utero* par injection de dexaméthasone à des rates gestantes amène

une diminution du poids fœtal à 21 jours¹³⁴. Les rats de cette progéniture démontrent une augmentation de l'expression des transporteurs de glucose cardiaques GLUT (transporteur de glucose) à l'âge adulte¹³⁴. Dans le cœur, l'expression de la protéine transmembranaire GLUT1 est augmentée en absence de modification de GLUT4 chez la progéniture de rat mâle. La voie intracellulaire Akt/PKB (sérine/thréonine protéine kinase spécifique / protéine kinase B) est d'ailleurs activée chez ces rats en plus de l'augmentation des protéines PKC (protéine kinase C) ce qui pourrait expliquer les changements d'expression des GLUTs¹³⁴. De plus, la progéniture à l'âge adulte démontre une hyperinsulinémie, un niveau élevé de corticostérone, une hypertension, une résistance à l'insuline ainsi qu'une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires^{134 82 169 178}.

Puisque chez l'humain, une corrélation a été observée entre le tabagisme et le petit poids de naissance, il a été proposé qu'un état d'hypoxie secondaire à l'exposition au CO₂ (dioxyde de carbone) en soit la cause¹⁴⁵. Ainsi, un modèle animal a été développé en infusant de la nicotine à des rates gestantes à une dose simulant les niveaux maternels plasmatiques de nicotine retrouvés chez les femmes fumeuses. Les rats exposés à la nicotine dans l'utérus ne relâchent pas les catécholamines en réponse à l'hypoxie et en ont une concentration cardiaque diminuée²¹³. L'hypoxie chronique qu'elle soit causée par des pressions en oxygène diminuées, une anémie maternelle ou par une atteinte de la perfusion placentaire, supprime la fonction cardiaque fœtale, altère l'expression des gènes cardiaques, augmente la densité et la synthèse des cytochromes mitochondriaux dont cytochrome c (lors d'une atteinte asymétrique) et augmente l'apoptose des cardiomyocytes. Ceci résulte en une sortie prématurée des cardiomyocytes de leur cycle cellulaire et à l'hypertrophie des myocytes²⁶⁹.

Un autre modèle de RCIU est induit en donnant à des rates gestantes une diète faible en protéines (LPD). Cette diète a pour effet de diminuer le poids total de la progéniture à la naissance ainsi que celui de leur cœur. Chez le rat, *in utero*, cette diète

est associée à une diminution de la croissance fœtale⁶⁴. En effet, à la naissance, cette diète réduit le nombre de cardiomyocytes dans le cœur des ratons RCIU, en activant l'apoptose^{64 52}. Cette progéniture démontre aussi une augmentation d'environ 15% du taux de fibrose interstitielle dans le ventricule gauche à l'âge adulte¹⁴². Ces altérations histologiques affectent la fonction cardiaque et prédisposent ces individus à développer une arythmie cardiaque et à des atteintes ischémiques^{265 142}.

Un dernier modèle RCIU a été induit par une ligature bilatérale des artères utérines au jour 19 chez des rates gestantes Sprague-Dawley. Cette ligature inflige au fœtus un environnement de croissance défavorable caractérisé par de faibles niveaux d'IGF (somatomédine), d'insuline, de glucose, d'oxygène et d'acides aminés²⁰⁹. Ces paramètres reviennent à la normale chez ces ratons dès la naissance. Cependant ces derniers demeurent avec un poids corporel réduit comparativement au groupe témoin. Chez cette progéniture, à 21 jours *postpartum*, le ratio NADH/NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide réduit / nicotinamide adénine dinucléotide) dans le muscle squelettique est réduit, indiquant une atteinte du métabolisme énergétique tissulaire de ces animaux²⁰⁹. À 3 mois *postpartum*, ces rats affichent une concentration sérique élevée en acides gras insaturés additionnée d'une hyperinsulinémie. Ceci s'accompagne, au niveau du muscle squelettique, par une diminution des réserves de glycogène, de la phosphorylation oxydative mitochondriale et de l'oxydation de plusieurs substrats énergétiques incluant le pyruvate, l' α -cétooglutarate, le succinate et le glutamate. Ces diminutions sont associées à une réduction de la production d'ATP. De plus, on note une diminution de l'activité de la PDH (pyruvate déshydrogénase) et augmentation de l'expression de la PDK4 (PDH kinase 4)²⁰⁹. Un défaut dans la synthèse et l'apport en ATP, débutant lors du pré-diabète (3 mois *postpartum*), diminue le recrutement membranaire de GLUT4, le transport de glucose intracellulaire et la synthèse de glycogène contribuant à la résistance à l'insuline et à l'hyperglycémie du diabète de type 2²⁰⁹. Les rats adultes de cette progéniture développent, 6 mois après la naissance, un diabète type 2

caractérisé par une hyperglycémie et de hauts niveaux tissulaires de lactate dans le muscle squelettique²⁰⁹.

En résumé, ces modèles présentent tous une cause différente menant à la RCIU. De plus, ils affichent des atteintes des cardiomyocytes (apoptose, hypertrophie), des altérations du métabolisme énergétique (augmentation du potentiel glucidique, diabète type 2) et de la fonction cardiaque (fibrose). Dans le cadre de cette étude, nous n'avons abordé que le profil métabolique cardiaque à l'âge fœtal du modèle RCIU développé au laboratoire. Par contre, il serait intéressant, dans le futur, d'aborder l'histologie des cardiomyocytes et la fonction cardiaque chez ces cœurs fœtaux afin d'apprécier les ressemblances/différences existants avec les autres modèles animaux RCIU. La RCIU est provoquée par de multiples causes chez l'humain. Chaque modèle animal présente un aspect causal particulier et relate les conséquences possibles de la RCIU induite.

1.1.3.2 Le modèle RCIU développé au laboratoire

Le rat, au même titre que la souris, a une cardiogenèse semblable à celle des humains. En effet, les événements du développement et du modelage cardiaque sont comparables allant du tube cardiaque primitif, en passant par la courbure en U et en S ainsi qu'au développement du système de conduction, jusqu'à la fermeture des différentes chambres ventriculaires et auriculaires^{65 109}.

Une courte durée de 22 à 23 jours (selon la souche) de gestation chez le rat permet une étude adaptée et facile des complications de grossesse. Notre laboratoire utilise la souche de rat Sprague-Dawley car celle-ci démontre une plus grande variabilité génétique comparativement à plusieurs souches consanguines, reflétant mieux la grande diversité génique présente dans la population humaine.

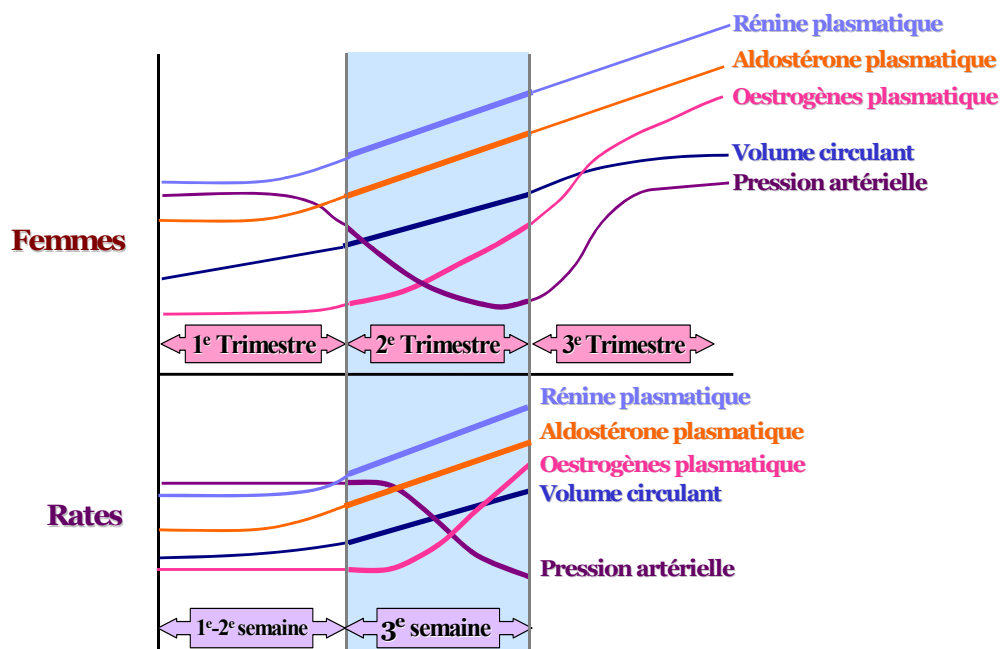


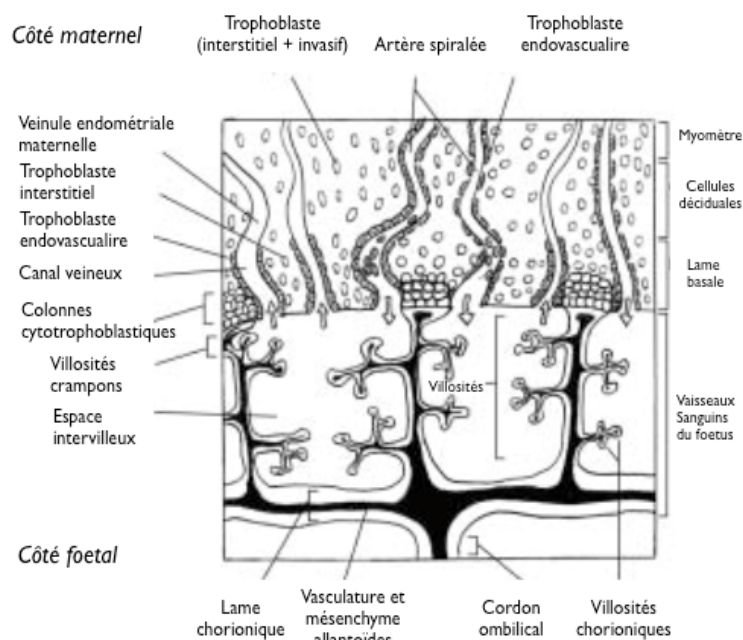
Figure 1. Comparaison des changements hémodynamiques qui surviennent lors de la grossesse humaine et la gestation d'une rate.

La gestation chez le rat est associée à des changements hémodynamiques similaires à la femme enceinte: augmentation du RAAS (système rénine-angiotensine-aldostérone), augmentation du volume sanguin, augmentation des estrogènes et diminution de la pression artérielle. De ce fait, il constitue donc un modèle adéquat pour l'étude phénomènes liés à la grossesse (voir figure 1). La principale différence entre les deux espèces (murine et humaine) concerne le moment auquel ces changements cardiovasculaires apparaissent au cours de la gestation. La majorité des changements survient à la dernière des 3 semaines de gestation chez la rate et au 2e trimestre chez la femme. Chez la rate comme chez l'humain, la gestation est accompagnée d'une résistance aux effets des vasoconstricteurs, démontrée *in vivo* et *in vitro* ^{48 158 216 14 26 27}.

Autant chez le rongeur que l'Homme, le placenta est hémochorial ^{97 245}. Cependant, chez le rongeur, le nombre de couches trophoblastiques est de trois comparativement à une chez l'Homme ^{97 128}.

De plus, l'invasion du mur utérin de ces espèces par les trophoblastes positifs au glycogène montre le même profil lors de la dernière période de gestation ²⁴⁵. Lorsque le placenta est complètement fonctionnel, l'invasion interstitielle et endovasculaire du mur utérin augmente à partir du jour 15 pour connaître un pic de profondeur au jour 18 avant de régresser jusqu'à la parturition ²⁴⁵. Dans les grossesses avec RCIU chez l'humain, les trophoblastes sont moins invasifs et plus prolifératifs. De plus, il y a réduction des dimensions des placentas, causée par une croissance plus faible des villosités et de la vasculature fœtale. Une résistance utéroplacentaire se met alors en place affectant la surface d'échange materno-fœtale ¹⁶⁰. Le placenta labyrinthique des rongeurs comparativement au placenta humain est caractérisé par plus d'interconnexions et d'arborescence des villosités. Le placenta des rongeurs possède donc moins d'espaces intervillositaires où se déverse le sang maternel, comme illustré à la figure 2 ⁹⁷.

A) HUMAIN



B) SOURIS

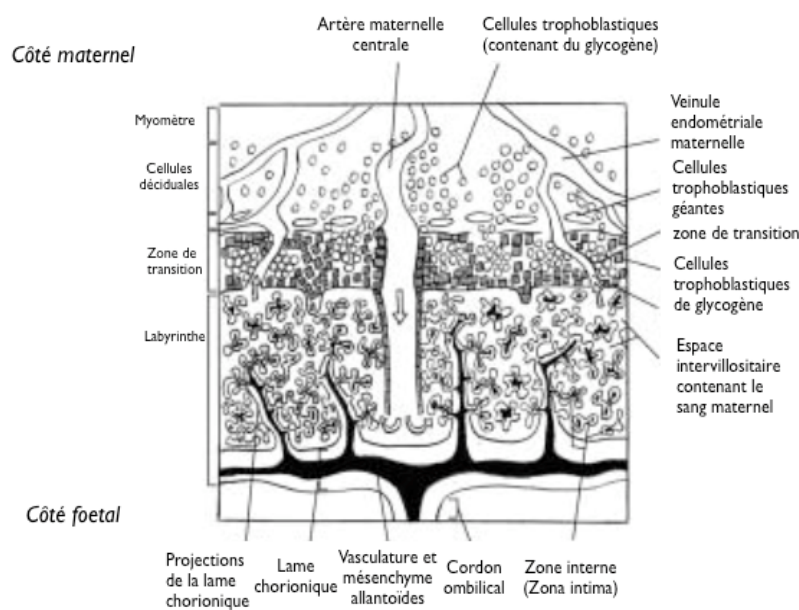


Figure 2. Régions principales et différents types cellulaires du placenta à terme.

Adapté par Bibeau K.³⁶ de Georgiades P.⁹⁷.

Placenta A) de l'humain et B) des muridés (rat ou souris) durant le troisième trimestre et la dernière semaine de gestation.

Lors des sept à huit derniers jours de gestation chez le rat, les artères utérines subissent un remodelage vasculaire. Ce dernier est une réponse à l'expansion considérable du volume sanguin maternel amenant l'accroissement de quinze à vingt fois du flot artériel utérin²⁰⁸. Le modèle développé dans le laboratoire, induit par une diète faible en sodium donnée à des rates lors de cette dernière semaine de gestation, perturbe cette augmentation du flot sanguin et diminue le remodelage vasculaire des artères utérines²⁰⁸. Cette perturbation, en plus de créer une RCIU, peut affecter la perfusion placentaire. En effet, la diminution du poids du placenta, de l'expansion volumique sanguine maternelle et du diamètre des artères utérines présente dans le modèle RCIU développé au laboratoire, suggèrent une baisse de perfusion placentaire^{33 208}. Cette atteinte peut affecter l'apport en nutriments au fœtus dans une période où ses besoins sont grandissants vu que sa croissance est à son apogée²⁰¹. Ces altérations ont des effets sur les échanges sanguins mère-fœtus pouvant affecter le développement fœtal. Le fœtus s'adapte en redistribuant son flot sanguin au profit du cœur et du cerveau mais au détriment entre autres des reins. Ce modèle est en conformité avec une RCIU idiopathique chez l'humain^{203 200}. Peu d'études à ce jour explorent ces RCIU idiopathiques.

Chez les rats RCIU du laboratoire, les ratios fœtaux du cœur au poids corporel et du cerveau au poids corporel sont élevés comparativement au groupe témoin³². De plus, à l'âge de 12 semaines (rat adulte), la pression sanguine systolique est élevée chez les mâles et les femelles RCIU³². De surcroît, les femelles RCIU du laboratoire ont une plus grande expression d'ARNm de l'ANP (peptide natriurétique de l'oreillette). Cette dernière est associée avec un remodelage cardiaque caractérisé par une augmentation de la largeur et du volume des cardiomyocytes, une augmentation de la longueur des sarcomères, une diminution de la contractilité des cardiomyocytes et une plus faible activité de l'aconitase³¹. Les ratios de poids des organes sur le poids corporel total démontrent que le modèle cause une RCIU asymétrique. Le ratio ventricule gauche au

poids corporel à l'âge adulte est en concordance avec un remodelage cardiaque. Il est élevé seulement chez les femelles RCIU ³¹.

1.2 Le placenta

1.2.1 Organogenèse et morphologie générale

Le placenta humain comporte une face maternelle composée d'une caduque basale en contact avec la muqueuse utérine et une face fœtale qui borde la cavité amniotique possédant un chorion embryonnaire ²³³. La morphologie de la face placentaire maternelle est irrégulière et formée de 10 à 40 lobes ou lobules constituant les cotylédons maternels. De petits vaisseaux sanguins émergent de l'utérus pour rejoindre la face maternelle du placenta. La face fœtale est raccordée dans la zone d'implantation au cordon ombilical qui se ramifie en 3 vaisseaux; 2 artères et une veine. Ces derniers vaisseaux se ramifient à leur tour à la face fœtale du placenta ²³³. La face fœtale du placenta de l'humain est appelée zone labyrinthe chez les rongeurs ⁹⁷.

1.2.2 Transfert de nutriments et autres fonctions

Le placenta, l'organe barrière entre la mère et le fœtus, devient fonctionnel à partir de la fin du 3^e mois de grossesse. Il joue un rôle endocrinien en synthétisant et sécrétant des hormones protéiques et stéroïdiennes. Il prend la relève du corps jaune pour sécréter l'œstrogène et la progestérone nécessaires à une grossesse normale en maintenant l'endomètre, préparant la lactation et la mère à l'accouchement ²³³. À partir de la 12^e semaine, le placenta sécrète la corticolibérine (CRH), normalement sécrétée par l'hypothalamus, stimulant la sécrétion de cortisol. Cette sécrétion permet la maturation des poumons fœtaux et leur production de surfactant ²³³. Le placenta de rat est fonctionnel lors de la 3^e semaine, le corps jaune demeurant présent tout au long de la gestation ^{196 245}. Le chorion, première partie de la face fœtale du placenta, sécrète plusieurs hormones dont le lactogène placentaire. Cette hormone stimule la préparation à la lactation postnatale, diminue l'utilisation maternelle de glucose

sanguin en augmentant la libération d'acides gras des tissus adipeux maternels. De cette façon, le glucose sanguin disponible est préservé pour le fœtus²³³. Des études *in vivo* chez l'humain montrent que la concentration en glucose dans la veine ombilicale est directement proportionnelle au glucose sanguin maternel^{157 156}. Lors de privation nutritionnelle maternelle chez le rat, l'augmentation de la lipolyse dans les tissus adipeux maternels, la néoglucogenèse fœtale et rénale maternelle compensent le manque glucidique *in utero*²⁷⁷.

Le placenta permet la diffusion de l'oxygène et des nutriments maternels au fœtus et l'élimination du CO₂ et déchets fœtaux vers le sang maternel. Un apport réduit en nutriments durant la période prénatale et postnatale interfère avec le taux de multiplication cellulaire de plusieurs organes et cette déléition est plus prononcée pour les organes à multiplication cellulaire rapide^{162 75}. Le glucose est le principal substrat du métabolisme énergétique chez le fœtus et le placenta humains^{28 149}. Le fœtus a une production de glucose minimale donc la seule source significative de glucose disponible pour lui est apportée par le transport placentaire par diffusion facilitée et par ses GLUT1 à la membrane plasmique des syncytiotrophoblastes^{28 122}. L'apport fœtal en glucose est dépendant de plusieurs facteurs tels le flot sanguin placentaire, l'aire d'échange, l'activité des transporteurs dans la barrière placentaire, les concentrations plasmatiques maternelles et le métabolisme placentaire¹⁴⁹.

Cette barrière placentaire est indispensable pour l'élimination des toxines et déchets fœtaux. Il empêche de plus le transfert de substances (drogues, médicaments, alcool) et microorganismes nuisibles au fœtus^{233 264 270 19}. De surcroît, le placenta joue un rôle dans le métabolisme des glucocorticoïdes via ses enzymes 11β-HSD2 (11bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase type 2) convertissant les hormones stéroïdiennes de la forme active à la forme inactive^{129 35}. De tous ces rôles assumés par le placenta, nous ne nous concentrerons qu'à celui de transfert de nutriments.

1.3 Le cœur

Le système cardiovasculaire est le premier système d'organes à se développer lors de l'embryogénèse et à assurer sa fonction définitive chez les vertébrés. Il est essentiel à l'apport en oxygène et nutriments aux organes embryonnaires^{13 103}. Le développement du cœur humain est similaire à celui de tous les mammifères incluant les souris mais avec des fenêtres de temps différentes^{65 11 109}.

1.3.1 Organogenèse

À partir du 22^e jour chez l'humain et du 9.5^e jour chez le rat, le système cardiaque se met en place et les contractions rythmiques débutent^{110 233}. Le cœur fœtal humain bat à 140-150 pulsations/minute. Les 4 cavités cardiaques sont bien délimitées à partir de la 6^e semaine²³³. Le développement cardiaque suivant compare principalement la souris, le rat et l'humain à la période prénatale.

Le mésoderme cardiaque se met en place lors de la gastrulation par l'apparition des tubes endocardiques qui fusionnent ensemble pour former le tube cardiaque primitif (humain 21 à 23 jours; souris E8.5; rat E10.5)^{65 109}. La courbure du tube cardiaque prend la forme d'un S avant d'effectuer une rotation selon l'axe céphalo-caudal (humain 26 jours; souris E10.5; rat 11.5-12.5)^{65 109}. Le cloisonnement auriculoventriculaire (AV) est possible grâce à l'expansion des appendices auriculaires et des composantes apicales ventriculaires qui formeront des bourrelets par expansion des cellules de l'endocarde (humain 6^e semaine; souris E13; rat 14.5)^{65 109 56}. Tôt dans le développement, peu après la formation des bourrelets endocardiques, le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) est spécialement exprimé et crucial pour la formation de la région AV du tube cardiaque^{103 167}. Le cloisonnement des oreillettes primitives est possible grâce à l'apposition de 2 septums (primum et secundum), tous les 2 munis d'un orifice (humain 7^e semaine; souris E18; rat 16.5). En

prénatal, le sang peut passer à travers ces deux orifices par le foramen oval. En postnatal, la pression artérielle grandissante provoque l'accolement de ces 2 septums fermant de ce fait la communication entre les oreillettes qui devient la fosse ovale ¹⁹⁸
^{65 109} .

La fermeture de la communication interventriculaire embryonnaire (humain 6-7 semaines; souris E13; rat 14.5) est possible par la fusion du septum musculaire et du septum spiral ^{65 109}. Cette étape permet au tronc artériel de former l'aorte, l'artère pulmonaire et la région ventriculaire près de ces vaisseaux. La veine cave supérieure et la veine cave inférieure se développent à partir du sinus veineux ^{65 109}. Dans le cœur humain à 45 jours (souris E16; rat 18.5-19.5), les murs des ventricules épaississent significativement sous contrôle de signaux de prolifération (facteurs de croissance des fibroblastes (FGF2 et son récepteur FGFR1), Wnts), l'acide rétinoïque et l'érythropoïétine qui émanent de la couche de l'épicarde ^{65 165 188 222}. Cet épaississement nécessite, pour palier à la diffusion sanguine maintenant insuffisante, la formation de la vasculature coronaire. Celle-ci est possible par l'accolement des cellules endothéliales et des muscles lisses dérivant des cellules de l'épicarde ^{76 252}. À cette étape, dans les zones trabéculaires des ventricules se forment les muscles papillaires des valves mitrale et tricuspide et la couche apicale du septum ventriculaire ¹⁰⁹ .

Les principaux médiateurs du développement cardiaque chez les mammifères sont des facteurs de croissance polypeptidiques angiogéniques : le VEGF, le FGF, le facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes ²³⁵. L'hormone oxytocine est responsable de la différenciation des cellules souches en cardiomyocytes tôt dans le développement cardiaque chez la souris (E2-E4) ¹⁸⁶. Plusieurs autres effecteurs hormonaux affectent le développement, la maturation et la fonction cardiaques fœtales à plus petite échelle: l'œstrogène, la progestérone, l'androgène, les

neurotransmetteurs (dont l'acétylcholine, la noradrénaline et l'adrénaline), l'IGF, le glucagon, l'insuline, la théophylline, la tyramine, l'AMPc, l'ANP^{259 59}.

1.3.2 Histologie

Durant les dernières étapes de développement et la période postnatale, chez l'humain et la souris, le cardiomyocyte au départ sphéroïde et immature s'allonge graduellement pour conserver une forme arrondie aux extrémités affilées.^{111 109}. Durant la croissance foetale, les cardiomyocytes s'hyperplasient et s'hypertrophient pour assurer la maturation myocardique, laissant place seulement à l'hypertrophie en fin de gestation et au début de la vie postnatale sous contrôle de l'hormone thyroïdienne^{183 64 99}. Chez le rat, les cardiomyocytes montrent une augmentation rapide de cellules binucléées durant la période de croissance néo postnatale^{64 126}. La proportion de cellules binucléées à terme est en théorie entre 1-33% dans le cœur humain^{161 126}. Chez l'humain, les cardiomyocytes représentent 75% du volume total du myocarde, mais de 15 à 35% du nombre de cellules total (8% chez le rat)¹²⁶. La balance cellulaire est composée en majeure partie de fibroblastes¹²⁶.

Les myocytes et les fibroblastes cardiaques sont interreliés et travaillent en symbiose. Un modèle de culture de cellules cardiaques néonatales de rats Sprague-Dawley a été développé pour investiguer cette affirmation. Des fibroblastes cardiaques sont semés au ratio de 1:4 myocytes cardiaques afin de voir l'effet des facteurs relâchés fibroblastiques (dosés par anticorps neutralisants) sur les cardiomyocytes¹⁰¹. On y a démontré que TGF- β 1 (facteur bêta 1 de croissance mitogène) et l'endothéline-1 sont relâchés par les fibroblastes en réponse à l'Ang II (angiotensine II) et ainsi promeuvent la croissance hypertrophique des myocytes cardiaques. Par contre, la susceptibilité à divers stimuli diffère entre les deux types cellulaires. En effet, dans un modèle de rats néonataux exposés à des concentrations élevées de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 100 à 800 M), les myocytes cardiaques montrent une plus grande fragmentation d'ADN

(acide désoxyribonucléique) et une plus faible survie que les fibroblastes suggérant leur plus grande vulnérabilité au stress oxydatif ²⁷¹.

Les mitochondries occupent de 20 à 40 % du volume du cardiomyocyte. La proportion de mitochondries dans les myocytes est corrélée directement au rythme cardiaque et à la consommation d'oxygène des espèces animales. Comparativement au cœur adulte, le cœur fœtal possède moins de mitochondries, dont les dimensions plus petites et la faible densité mûrissent à la fin de la gestation pour être extrêmement productives à la naissance ²¹⁴.

1.3.3. Substrats énergétiques

Les substrats énergétiques cardiaques sont: les acides gras, le glucose, le lactate, les corps cétoniques. Le substrat énergétique primaire change en fonction du statut développemental (période prénatale et postnatale), du contexte hormonal et physiologique ou pathologique. Nous décrivons dans cette section l'utilisation des substrats énergétiques cardiaques en fonction de la période développementale étudiée. La figure 3 résume le changement de substrat énergétique en période périnatale.

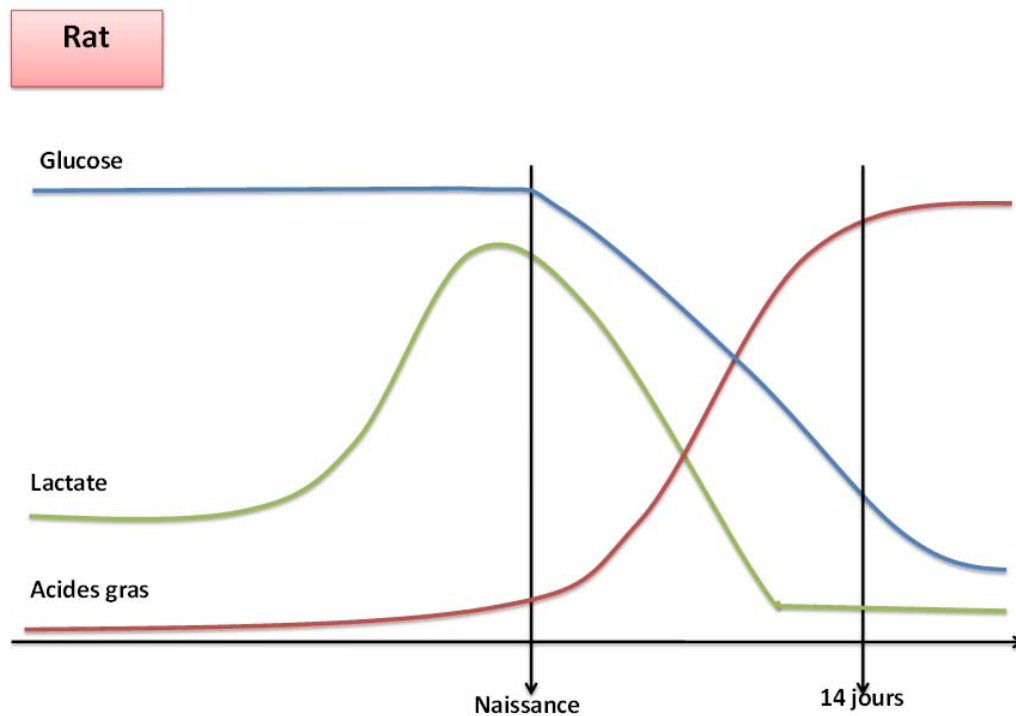


Figure 3. Substrats énergétiques en période périnatale chez le rat. (figure qualitative)

Adapté de Ascuitto R.J., 1996¹³; Drake A.J., 1980⁸⁴; Lavrentyev E.N., 2004¹³⁷; Onay-Besikci A., 2006¹⁸¹.

Le fœtus reçoit des glucides et des acides aminés par le placenta, mais peu d'acides gras (stockés dans le foie fœtal et les tissus gras) ce qui réduit la β -oxydation. Les lipides fœtaux sont donc une combinaison de synthèse endogène et de transfert d'acides gras libres de la mère par diffusion facilitée à travers le placenta^{60 218 140}. À la fin de la gestation, le fœtus accumule rapidement des acides gras sous forme de TAG (triglycéride, triacylglycérol, triacylglycéride), du glucose sous forme de glycogène et active la gluconéogenèse afin de se pourvoir d'une réserve énergétique pour palier à la restriction nutritionnelle causée par l'accouchement et les premières heures postnatales¹²⁴. À la naissance, la concentration de glucose plasmatique du nouveau-né dépend de plusieurs facteurs tels le dernier repas maternel, la durée de l'accouchement, le mode d'accouchement, et le type de liquide intraveineux administré à la mère^{66 67}. Après la naissance, l'individu est dépendant des nutriments contenus dans le lait maternel et sa capacité de néoglucogenèse hépatique pour

maintenir des concentrations sanguines normales de glucose¹³⁷. Le lait maternel de rat contient (1) une molécule de lactose pour (10) dix molécules de gras dont 95% se retrouvent sous forme de TAG¹³⁷. Le nouveau-né est considéré en transition entre 2 états nutritionnels (fœtus et postnatal) et est vulnérable au déséquilibre en glucides. Le maintien de la glycémie est spécialement difficile chez un nouveau-né malade et/ou à faible poids⁶⁶.

En période prénatale, le glucose est le substrat énergétique prioritaire cardiaque car:

- a)** c'est le substrat sanguin le plus transféré par la mère;
- b)** il y a une inhibition de la β -oxydation par le malonyl CoA (CoA : coenzyme A), métabolite de la glycolyse;
- c)** la concentration des LCFA (acides gras à longue chaîne hydrocarbonée) est basse;
- d)** les niveaux de carnitine et des enzymes de la β -oxydation des acides gras (dont MCAD; déshydrogénase pour les acyl à moyenne chaîne hydrocarbonée) dans le myocarde sont bas et;
- e)** l'activité de la CPT1 (carnitine palmitoyl transférase 1) est réduite^{192 30 181 137}.

À la naissance, l'expression cardiaque des transporteurs et des enzymes du métabolisme des acides gras (dont MCAD) est augmentée permettant aux acides gras de devenir la source énergétique principale durant les deux premières semaines de vie^{171 41 137 237}. Durant les 2 premières semaines en postnatal, l'expression cardiaque des gènes contrôlant le transport du glucose et de son oxydation est diminuée. De plus, l'activité des enzymes HK (hexokinase) et PK (pyruvate kinase) de la glycolyse, est diminuée de deux fois dans le cœur de rat comparativement au cœur fœtal à 22 jours^{133 13 137}. Pendant cette même période, l'activité de la citrate synthase et de la malate déshydrogénase, catalysant la première et la dernière étape du cycle de Krebs respectivement, augmentent de deux à quatre fois dans le cœur de rat comparativement au cœur fœtal à 22 jours^{12 13}. L'activité des enzymes cytochromes de la chaîne respiratoire mitochondriale augmentent également de deux à quatre fois

dans le cœur de rat à ce moment comparativement au cœur fœtal à 22 jours^{12 13}. Ces données attestent une biogenèse mitochondriale importante en période périnatale. L'oxydation des lipides en postnatal dépend des apports et dépenses en énergie, de la quantité de glucose apportée, du ratio glucides/lipides, de l'âge gestationnel et du poids de l'enfant. La thyroïde et le système nerveux sympathique sont impliqués dans la maturation et la fonction du cœur. Ils auraient également un rôle à jouer dans le changement de substrat énergétique primaire au début de la période postnatale²³⁷. Dans les myocytes cardiaques de rats néonataux, l'hormone thyroïdienne triiodothyronine et les agonistes β -adrénergiques causent l'augmentation d'expression en ARNm des UCP-2 (protéine de découplage 2) de la chaîne respiratoire mitochondriale¹³⁵. Cette augmentation d'expression génique d'UCP-2 n'est possible qu'en présence d'acides gras (acides palmitique et oléique) puisque ces derniers lieront PPAR α (récepteur alpha au facteur activé de prolifération des peroxysomes) pour induire la transcription génique d'UCP-2 entre autre²³⁸. Par contre, ces niveaux d'expression d'UCP-2 sont insensibles aux modulations des acides gras dans le cœur adulte²³⁸. De plus, dans les ventricules de cœurs de rat néonataux et fœtaux, les hormones thyroïdiennes augmentent la synthèse des chaînes lourdes α de la myosine (unité contractile des sarcomères). La hausse des chaînes lourdes α de la myosine des cardiomyocytes est responsable de leur hypertrophie normale en période périnatale⁵⁴. Ce changement d'unité fonctionnelle modifie également le phénotype contractile des cardiomyocytes.

Dans le cœur adulte normal, 95% de ses besoins en énergie sont obtenus par l'oxydation des acides gras et des glucides: 60-90% de l'acétyl CoA provient de la β -oxydation des acides gras et 10-40% de l'oxydation du pyruvate¹⁴⁶. En période néonatale, le lactate plasmatique diminue drastiquement et les acides gras libres augmentent grâce à l'apport maternel en lait pour rejoindre les valeurs observées dans un cœur adulte^{164 13}. Le lactate est un substrat énergétique cardiaque à la fin de la

gestation en prénatal et durant une période d'exercice en postnatal^{13 84}. Dans des conditions normales, les acides aminés ne constituent pas une source énergétique importante. Par contre, ils le deviennent lorsque l'environnement devient anaérobie.

À partir de la naissance, le substrat cardiaque prioritaire est le LCFA (14 à 24 carbones), principalement l'acide oléique et l'acide palmitique¹³. Ces LCFA peuvent aussi être utilisés pour constituer la membrane plasmique. Les SCFA (acides gras à courte chaîne hydrocarbonée; 4 à 7 carbones) sont utilisés directement par le cœur en diffusant à travers la membrane plasmique et la mitochondrie pour former de l'acétyl CoA et n'entrent pas dans le cycle de la β -oxydation¹³.

1.4 Métabolisme énergétique cardiaque

Le cœur possède peu de réserves énergétiques, il est donc ultimement dépendant des substrats sanguins. Le métabolisme énergétique cardiaque est influencé par la disponibilité de ses substrats (voir figure 4 pour métabolisme énergétique cardiaque). Le glucose est rapidement métabolisé et produit moins d'ATP par mole de substrat que l'oxydation des acides gras (voir tableau 2). La fonction cardiaque est en rapport étroit avec l'état hypoxique et le métabolisme énergétique de cet organe. Par exemple, lors d'ischémie secondaire à un infarctus du myocarde, le cœur privilégie l'utilisation du glucose par la voie de la glycolyse anaérobie. Cette situation provoque l'accumulation de protons H^+ et de lactate dans les cardiomyocytes. Cette accumulation de métabolites conduit à une acidose intracellulaire. Cette acidose diminue la performance cardiaque. Au niveau cellulaire, ce changement de pH provoque l'ouverture du pore transitoire de perméabilité (PTP) de la mitochondrie induisant l'apoptose⁷⁴.

L'efficacité maximale cardiaque à transformer les substrats énergétiques en chaleur et en travail de contraction est de l'ordre de 20 à 25% dans un cœur sain et 5 à 10% dans un cœur défaillant. Le rapport de la consommation en oxygène du cœur (VO_2) avec son

travail mécanique (pression systolique, pression artérielle moyenne) constitue une mesure de l'efficacité cardiaque et est proportionnelle à l'énergie chimique libérée (ATP)²⁴⁷.

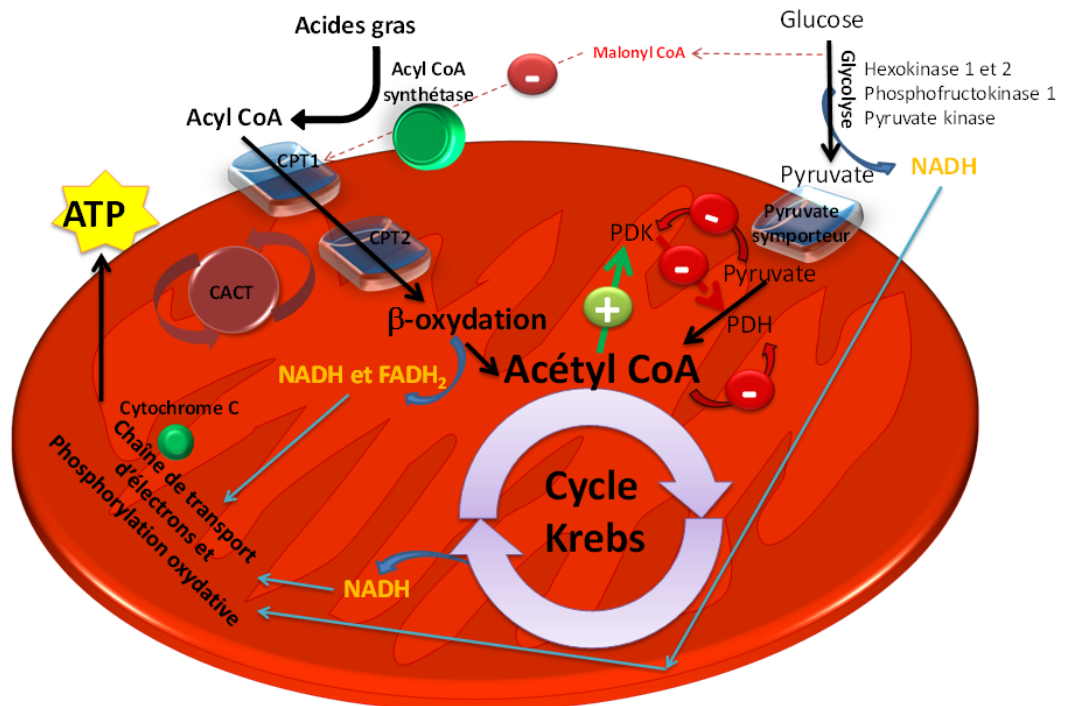


Figure 4. Vue d'ensemble du métabolisme énergétique cardiaque.

La glycolyse utilise du glucose dans le cytosol pour le métaboliser en pyruvate qui entre dans la mitochondrie afin d'être transformé en acétyl CoA. Les acides gras à longues chaînes du cytosol sont transformés en acyl CoA à longues chaînes par l'acyl CoA synthétase avant d'être transférés dans la mitochondrie par le système CPT1-CACT-CPT2 afin d'entrer dans le cycle de la β -oxydation pour former de l'acétyl CoA. L'acétyl CoA des 2 voies métaboliques entrent dans le cycle de Krebs afin de former du NADH. Du NADH est formé par la glycolyse. Du NADH et du $FADH_2$ sont formés durant la β -oxydation. Ces NADH et $FADH_2$ entrent dans la chaîne de transport d'électrons en conjonction avec la phosphorylation pour ultimement former de l'ATP (adénosine triphosphate).

1.4.1 Glycolyse

Le glucose et le glycogène constituent les principaux substrats de la glycolyse. Il existe d'autres substrats hexoses potentiels à cette voie métabolique, utilisés une fois métabolisés en glucose par le foie. En effet, le galactose (produit de l'hydrolyse du lactose), le mannose (produit de polysaccharides et glycoprotéines) et le fructose (produit direct des fruits ou de l'hydrolyse du saccharose) contribuent pour 20% de tous les sucres absorbés de l'alimentation (80% glucose). Ils sont transformés en

glucose par le foie pour ainsi être relâchés dans la circulation sanguine et utilisés en tant que substrats à cette voie métabolique ²⁴⁷. Le métabolisme du glucose est d'importance vitale pour le cardiomyocyte pour deux raisons. Premièrement, une petite quantité d'ATP (adénosine triphosphate) peut être obtenue du métabolisme du glucose même en absence d'oxygène par la production anaérobie de lactate, par exemple pendant une ischémie. Clairement insuffisant pour assurer la fonction cardiaque, cet ATP permet toutefois la survie des cardiomyocytes en attendant la reperfusion. Deuxièmement, l'ATP obtenu de la glycolyse, alimente prioritairement les pompes membranaires qui entretiennent les gradients de sodium (Na^+), potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}) à travers la membrane cellulaire ²⁴⁷.

1.4.1.1 Transport membranaire du glucose

À cause de sa nature hydrophilique, le glucose est incapable de passer la membrane plasmique par diffusion simple et a donc besoin de transporteurs ²¹. Il existe 2 familles de transporteurs de glucose cardiaques: les protéines GLUT (transport facilité) et les SGLT (protéine de transport sodium-glucose) ²¹. La prise de glucose myocardique est en premier lieu sous la gouverne des GLUT1 et GLUT4 ^{234 217 34 119 278 215}. GLUT1 est le transporteur basal de glucose et compte pour environ 30% de tous les transporteurs de glucose à l'âge adulte ^{234 91 138 204}. L'expression génique cardiaque des GLUT1 atteint son apogée chez le fœtus ^{234 204}. La contribution des GLUT1 au transport de glucose est plus grande en fin de gestation et en période néonatale lorsque l'expression des GLUT4 (contrôlé par l'insuline) est basse ^{137 223}. GLUT1 correspondent à l'isoforme prédominante trouvée dans tous les tissus fœtaux cependant elle perd sa priorité à la naissance au profit des GLUT4 à la hausse, sous l'effet d'hormones thyroïdiennes et de l'insuline, rendant le cœur ainsi insulino-dépendant ^{181 193 50}. La hausse d'expression des GLUT4 est due à l'activation de la voie des p38 MAPK/MEF2 (protéine kinase au facteur activé mitogène / facteur 2 d'amplification des myocytes) ¹⁶⁸. Sp1, le facteur de transcription de MCAD et GLUT1, est diminué après la naissance, mais augmenté dans l'hypertrophie. Il est donc impliqué dans la diminution de l'expression de MCAD et

GLUT1 à la naissance²⁰⁴. Un traitement à long terme à l'insuline augmente aussi la quantité de GLUT1 cardiaque¹³⁸. GLUT1 a seulement un site de liaison au glucose mais a une très grande affinité pour son substrat²⁸.

Tel qu'illustré à la figure 5, GLUT4 est augmenté en réponse à l'insuline et à un exercice physique^{207 21}. L'insuline suite à la liaison à son récepteur et à l'activation successive d'IRS1-2 (signaux 1-2 du récepteur à l'insuline), induit la translocation de GLUT4 via PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) qui stimule l'activité de PDK1/2 (pyruvate déshydrogénase kinase 1/2) et subséquentement de PKB et PKC. L'adrénaline lié à son récepteur β -adrénergique couplé à une protéine G_s active l'adénylate cyclase (AC) qui active subséquentement la glycogénolyse cardiaque et ce qui activera la PKA (protéine kinase A) conduisant à l'apoptose du cardiomyocyte^{269 273 96 62}. La liaison de l'insuline à son récepteur active aussi la voie des p38 MAPK ce qui augmente l'efficacité des GLUT4 à la membrane. Il semblerait que l'exercice, via des vésicules différentes à celles de l'insuline, influencerait directement le recrutement des GLUT4 à la membrane en activant la voie de l'AMPK (AMP kinase) stimulant la voie des p38 MAPK²²⁹.

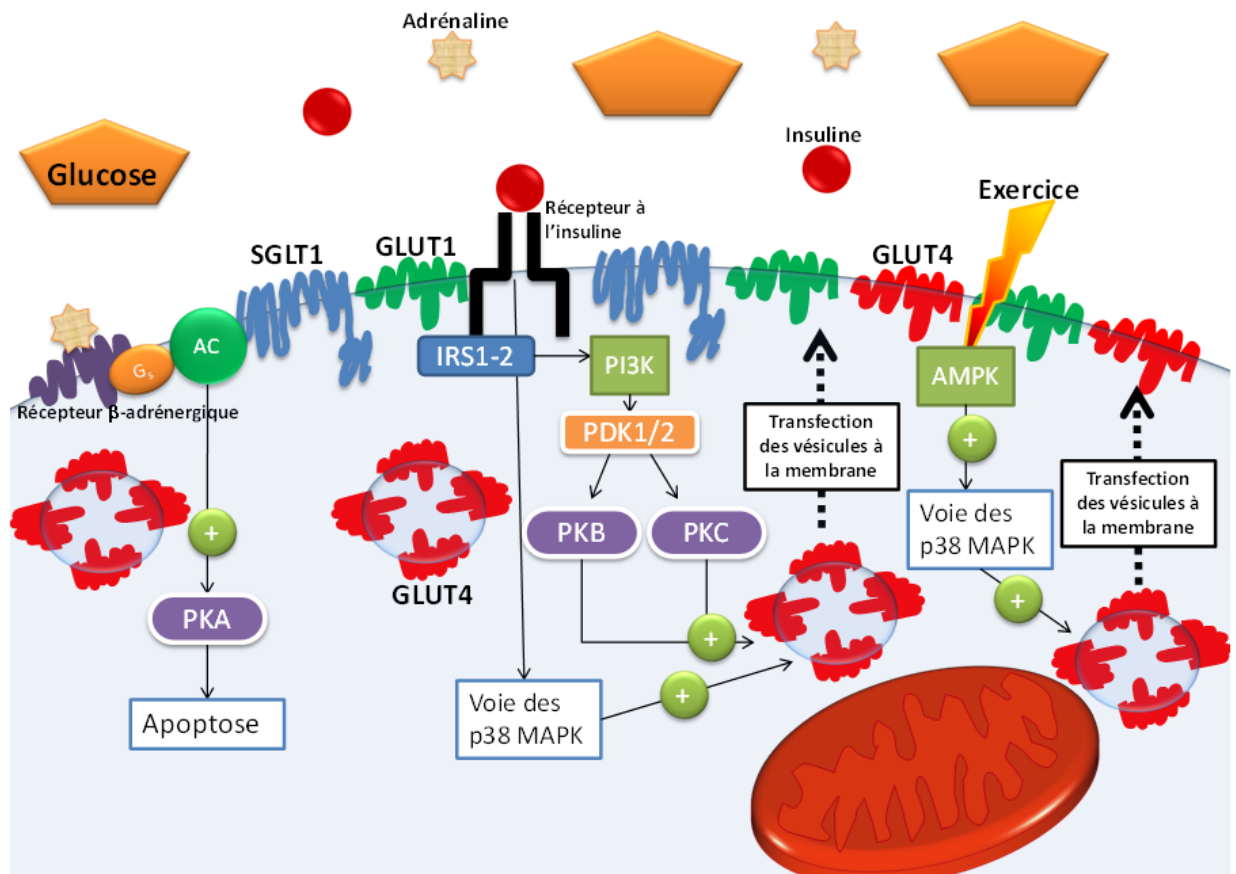


Figure 5. Transport membranaire du glucose cardiaque.

Les SGLTs transportent une variété de substrats (sucres, inositol, iodure, urée, proline) dans la cellule utilisant le gradient électrochimique des cations Na^+ ²⁶². Les SGLT1 dans les cardiomyocytes, colocalisent principalement avec les GLUT1 et les pompes Na^+/K^+ ATPase (un marqueur positionnel) au niveau du sarcolème et dans une moindre mesure avec les GLUT4 dans les vésicules intracellulaires ²¹. L'administration aigüe de leptine à des souris augmente l'expression cardiaque des SGLT1 d'approximativement sept fois ²¹. L'entrée cellulaire de glucose stimulée par l'insuline et la leptine est inhibée par l'administration de la phlorizine, inhibiteur des SGLT1 ²¹. L'insuline active PKC qui lui phosphoryle les SGLT1 et ainsi active leur recrutement à la membrane plasmique ²¹. Une étude avancerait qu'il y a peu ou pas de SGLT1 exprimés dans le

cœur de rat mais beaucoup chez les souris et l'humain (immunobuvardage de type Northern non confirmé par réaction en chaîne par polymérase en temps réel)²⁷².

1.4.1.2 Glycolyse

Une fois dans le cytosol, le glucose entre directement soit dans la synthèse de glycogène (glycogénogenèse), soit dans son métabolisme catabolique (glycolyse), soit dans la voie des pentoses phosphates (PPP) pour former des riboses (utilisés en tant qu'acides ribonucléique dans la synthèse protéique)¹³. La synthèse de riboses est normalement basse dans le myocarde adulte mais est élevée dans les tissus fœtaux et néonataux¹³. La glycolyse en aérobie (figure 6) est caractérisée par 10 étapes séparées en 2 phases: phase d'investissement (réactions 1 à 5) et phase de libération d'énergie (réactions 6 à 10). À partir d'un glucose, à travers la glycolyse, il y a utilisation de 2 ATP (étapes 1 et 3), génération de 4 ATP (étapes 7 et 10), production de 2 pyruvates (étape 10), 2 NADH (étape 6) et relâche de 2 H⁺ (étape 6).

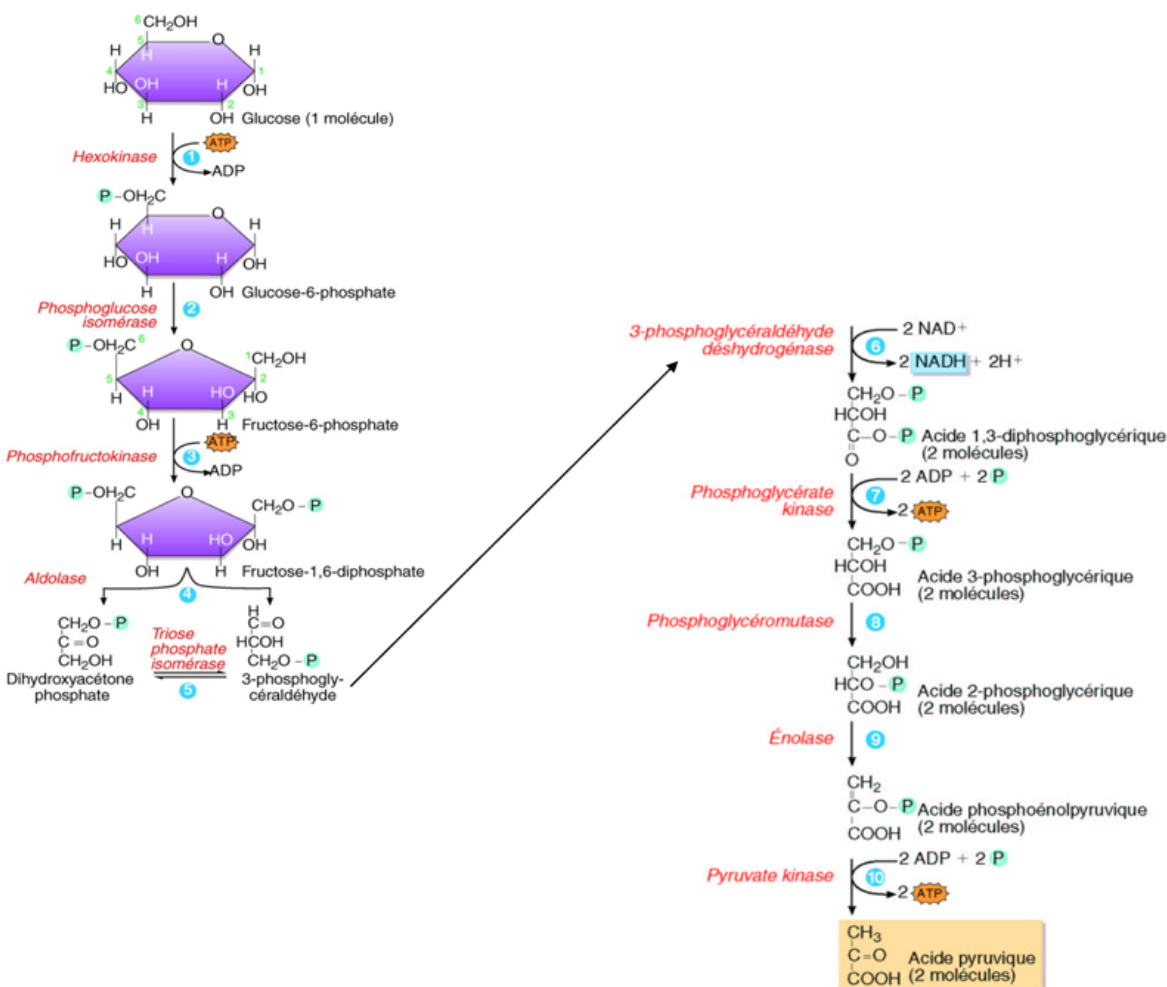


Figure 6. Voie de la glycolyse

Adaptée de Tortora J.R., 2001²³²

Le glucose passe par une phosphorylation par l'HK à l'étape 1 pour être ensuite transformé en son isomère le F-6-P (fructose-6-phosphate) à l'étape 2 qui sera phosphorylé par la PFK (phosphofructokinase) à l'étape 3. Le produit fructose-1,6-phosphate est scindé à l'étape 4 en 2 isomères pouvant passer de l'un à l'autre grâce à la TIM (triose phosphate isomérase : étape 5). Par la suite, le produit GAP (3-phosphoglyceraldéhyde) est oxydé et phosphorylé consécutivement par la GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) à l'étape 6 pour ensuite être oxydé en groupement carboxyle à l'étape 7. L'étape 8 est caractérisée par un déplacement de groupement phosphate et l'étape 9 par la formation d'une double liaison par une énolase. À l'étape 10, les PEP (acide phosphoénolpyruvique) sont déphosphorylés en pyruvate par la pyruvate kinase.

1.4.1.3 Étapes limitantes de la glycolyse

Pour qu'une enzyme ait le qualificatif de limitante *in vitro*, elle doit générer une réaction irréversible. Par ce principe, le produit synthétisé/transformé ne peut retourner à sa forme substrat d'origine une fois la réaction enzymatique accomplie. De

plus, ces réactions enzymatiques se produisent sous une vitesse limitante, c'est-à-dire que leur ΔG (variation d'énergie libre) de réaction est loin de l'équilibre déterminé par les autres enzymes non-limitantes de la voie métabolique et que leur inhibition amène une inhibition importante de cette même voie métabolique ²⁴⁷. Il existe 3 enzymes limitantes glycolytiques: PFK (phosphofructokinase), PK et HK ¹⁴⁹. Cependant, ce principe d'enzymes limitantes ne demeure que purement théorique, ne s'appliquant que sous des conditions *in vitro*. Dans la plupart des cas, chaque enzyme est étudiée individuellement, dans des tampons différents, ne prenant pas en compte la synergie et l'équilibre pouvant s'établir ²⁴¹. Lors de ces expériences, la cinétique des enzymes est étudiée à capacité maximale ²⁴². Cette dernière demeure souvent non atteinte en conditions physiologiques *in vivo*. De plus, *in vivo*, la capacité maximale enzymatique est affectée par la quantité disponible en substrat ainsi que par la composition en macromolécule du milieu cytosolique ²⁴³. Le métabolisme cellulaire est en constant changement afin de maintenir ses fonctions cataboliques. En effet, la quantité d'enzymes et d'intermédiaires est continuellement ajustée, utilisant de façon optimale les ressources intracellulaires. Ce réajustement est nécessaire afin de répondre aux demandes métaboliques changeantes, assurant une stabilité de la voie métabolique ²⁴⁴. Pour terminer, le principe d'enzymes limitantes dans la glycolyse n'est pas applicable *in vivo* puisqu'il impliquerait une accumulation de substrats intermédiaires en amont de ces enzymes. De plus, ce principe ne considère pas les voies métaboliques adjacentes et complémentaires à celle de la glycolyse. Toutefois, dans le but de dresser un profil du métabolisme cardiaque glycolytique, l'étude de la quantité protéique totale des enzymes dites limitantes *in vitro* constituera le point de départ.

a) Hexokinase

L'hexokinase phosphoryle le glucose en G-6-P (glucose-6-phosphate), tel que décrit à la figure 6 étape 1. Ce dernier est ensuite emprisonné dans la cellule, ne pouvant retourner sous cette forme dans la circulation. Cette réaction permet de maintenir la concentration de glucose intracellulaire basse créant le gradient de concentration

nécessaire pour le flux continu de glucose dans les myocytes. Le produit G-6-P est un inhibiteur allostérique d'HK ²¹⁵. L'HK utilise comme substrat secondaire un complexe Mg^{2+} -ATP, l'ATP seul inhibant la HK de façon compétitive ²⁴⁷. Lorsque le substrat de la glycolyse est un glucose provenant de la glycogénolyse plutôt qu'un glucose sanguin, la HK n'intervient pas car ce dernier est déjà sous sa forme phosphorylée (G-6-P). Le cœur exprime 2 isoformes de HK: 1 et 2.

L'hexokinase dans le cœur subit une translocation à la mitochondrie ²¹⁵. La liaison à la mitochondrie a plusieurs avantages biochimiques :

- a)** HK est moins susceptible à l'inhibition par son produit;
- b)** un accès préférentiel pour HK à l'ATP produit par la mitochondrie (via un canal voltage dépendant anion-adénine nucléotide);
- c)** un accès direct pour la mitochondrie à l'ADP généré par HK (via un échangeur adénine nucléotide) ^{215 15 72 98}.

Cette liaison pourrait avoir certains autres avantages comme : réduire la libération dans le cytosol des ROS (dérivés réactifs de l'oxygène) mitochondriaux et prévenir l'apoptose ^{215 17 68 153 187}. En conditions basales dans les cœurs de rats, la fraction de HK1 liée à la mitochondrie est 5 fois plus grande que celle de HK2. La liaison HK-mitochondrie augmente sous stimulation par l'insuline ou l'ischémie (par 2 fois pour HK1 et 4 fois pour HK2) ²¹⁵. Ces événements sont spécifiques à l'isoforme suggérant que HK1 et HK2 sont indépendamment contrôlés. Ceci implique que les isoformes de HK occupent des rôles différents dans la régulation de la glycolyse cardiaque ²¹⁵. HK1 serait impliqué dans le catabolisme tandis que HK2 serait impliqué dans l'anabolisme ^{215 260}. HK1 est associé avec GLUT1 et HK2 avec GLUT4 ¹³. En présence d'acide oléique (conditions physiologiques) HK1 demeure relativement insensible à l'insuline suggérant que le catabolisme du glucose cardiaque n'est pas augmenté avec la hausse des concentrations sanguines de glucose ²¹⁵. Il existe deux rôles proposés pour HK1: maximiser la production de G-6-P en temps de besoin extrême et occuper les sites de

liaisons mitochondriales qui seraient normalement occupés par Bax et Bak initiant l'apoptose durant ou après une atteinte ischémique²¹⁵. HK1 est important dans le cœur fœtal tandis que HK2 est l'isoforme prédominante dans le cœur adulte^{57 13 234}. L'augmentation d'expression des HK1 dans le cœur adulte correspond donc à un retour vers un phénotype métabolique fœtal. Ce phénomène est présent lors d'hypertrophie pathologique cardiaque¹⁹⁴.

b) Phosphofructokinase

La PFK est une enzyme tétramérique qui utilise comme substrat secondaire un complexe Mg^{2+} -ATP. Chaque sous-unité possède 2 sites de liaisons à l'ATP; un substrat et un régulateur négatif. La PFK est présente sous 2 conformations: R et T²⁰⁶. Lorsqu'elle est sous sa conformation T, l'ATP ne peut lier le site régulateur mais peut lier le site substrat tandis que la F-6-P (fructose-6-phosphate) ne peut lier la PFK qu'en état R²⁰⁶. L'ATP devient donc un inhibiteur de la PFK car sa liaison en T inhibe le changement de conformation de l'enzyme et l'affinité de cette dernière pour le F-6-P^{247 206}. La PFK module son activité en fonction du rapport ADP/ATP. L'activité de la PFK est augmentée de façon allostérique par l'AMP et l'ADP (en levant l'inhibition par l'ATP). Elle est inhibée de façon allostérique par l'ATP (en plus d'être un substrat de la réaction), un pH élevé, de hautes concentrations en acides gras libres et le citrate (provenant du cycle de Krebs soit par la glycolyse soit par la β -oxydation des acides gras)²⁴⁷. La surexpression de PFK affecte peu ou pas la vitesse de réaction. Ceci est confirmé par la symbiose et l'équilibre des enzymes de la glycolyse, éliminant le concept d'enzymes limitantes. Le contrôle de la glycolyse est donc distribué à l'ensemble des enzymes de cette voie puisqu'une augmentation ponctuelle de la PFK supposée être limitante n'a que peu d'effet sur la glycolyse en général. PFK a 2 isoformes : PFK1 et PFK2. PFK2 contrairement à PFK1 catalyse une réaction enzymatique réversible. PFK1 a une grande activité et est peu affectée par les régulateurs inhibiteurs dans le cœur fœtal comparativement à celui de l'adulte¹³. Le fructose-2,6-biphosphate (produit par la PFK2 adjacente) est un stimulateur potentiel de la PFK1 en levant l'inhibition induite

par un pH faible, des niveaux bas de citrate (produit du cycle de Krebs) et d'ATP^{13 42}. La polymérisation de PFK1, c'est-à-dire la formation du tétramère, active grandement l'enzyme²⁴⁷.

c) Pyruvate Kinase

L'activité de la PK requiert des cations monovalents et divalents que sont K^+ et Mg^{2+} . La PK catalyse le transfert d'un groupement phosphoryl du PEP vers l'ADP et est présente sous 4 isozymes chez les mammifères: L (*liver*), R (*red blood cell*), M1 et M2 (muscle)¹¹⁵. Elles sont toutes tétramériques et allostériques à l'exception de M1 qui a une cinétique enzymatique hyperbolique^{115 116 175}. M1 et M2 sont le produit d'un seul et même gène subissant un épissage alternatif et codant chez le rat pour 56 acides aminés dont 21 sont différents correspondant à la région de contact intersous-unités^{10 115 174 227 228}. M1 est exprimée dans les organes très énergivores que sont le muscle squelettique, le cœur et le cerveau; M2 est présent dans les tissus embryonnaires et tumoraux^{115 116}. Il existe donc un changement du patron d'expression des isoformes M2 à M1 dans le cœur à la naissance^{115 185}. PKM2 est moins sensible à l'inhibition par l'ATP que PKM1^{13 12}. Le pyruvate formé favorise la sortie de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique. Lorsque la pyruvate kinase est phosphorylée par la PKA, son activité est augmentée même en absence de fructose-1,6-phosphate qui l'active normalement¹⁹¹.

1.4.1.4 Catabolisme du pyruvate dans la mitochondrie

La glycolyse aboutit à la formation du pyruvate qui est importé dans la mitochondrie par un symporteur-proton K^+ . Les dernières étapes de l'oxydation du glucose se produisent dans la mitochondrie et permettent la production d'une grande quantité d'énergie. Ainsi le pyruvate est décarboxylé par le complexe enzymatique PDH en NADH, $FADH_2$ (forme hydroquinone de FAD (dinucléotide adénine flavine)) et acétyl CoA. Ce dernier est également produit par la β -oxydation des acides gras et sera utilisé par le cycle de Krebs afin d'alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale en

équivalents réduits (voir section 1.4.3). Le catabolisme du pyruvate dans le cœur de rat est limité par l'état de phosphorylation de la PDH. En effet, la PDH est inhibé lorsque phosphorylée par PDK (PDK: 1, 2 et 4 dans le cœur de rat adulte et plus -4 que -1 en développement) (voir la figure 4) ⁴⁰. Cette PDK est activée par le NADH et l'acétyl CoA, mais le pyruvate supprime son activité ^{40 134}. La PDH est activée par sa déphosphorylation par une pyruvate déshydrogénase phosphatase ou par une augmentation du ratio acétyl CoA/CoA, du ratio NADH/NAD et de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ ¹³. L'acétyl CoA dérivant de la β-oxydation des acides gras inhibe la PDH : c'est le cycle Randle ¹⁹⁵.

1.4.2 β-oxydation des acides gras

PPARα est le principal régulateur de transcription des enzymes de la β-oxydation des acides gras et son expression génique développementale est corrélée avec l'expression des gènes des enzymes de la β-oxydation dans le cœur ^{130 139 102 41}. Dans le cœur, MCFA (acides gras à moyenne chaîne hydrocarbonée) et LCFA sont les principaux ligands activateurs de PPARα. Les acides gras insaturés ont plus de potentiel à lier PPARα que les saturés ^{130 131 144}. Il existe aussi d'autres ligands de PPARα tels les métabolites des lipides que sont les eicosanoïdes et les leucotriènes ^{130 146 102 114}. L'expression de PPARα est augmentée en période postnatale et lors d'un jeûne de court terme, d'un entraînement ou d'un exercice. L'expression de PPARα est diminuée par l'hypertrophie causée par une surcharge de pression et une défaillance cardiaque ¹⁴⁶.

Classe de protéines	Protéine Cible	Définition de l'abréviation de la protéine cible
Transport, liaison cytosolique et estérification des acides gras	FATP	<i>fatty acid transporter protein</i> ; protéine de transport des acides gras
	FAT/CD36	<i>fatty acid transporter/cluster of differentiation type 36</i> ; transporteur des acides gras/cluster de différenciation type 36
	FABP	<i>fatty acid binding protein</i> ; protéine de liaison des acides gras
Importation des acides gras dans la mitochondrie β -oxydation dans la mitochondrie	CPT1 β	carnitine palmitoyl transférase de type 1 bêta
	MCAD	déshydrogénase pour les acyls à moyenne chaîne hydrocarbonée
	LCAD	déshydrogénase pour les acyls à longue chaîne hydrocarbonée
	VLCAD	déshydrogénase pour les acyls à très longue chaîne hydrocarbonée
β -oxydation dans le peroxyosome La chaîne respiratoire mitochondriale	KT	β -cétoacyl-CoA thiolase
	ACO	acyl CoA oxydase
Coactivateurs de PPAR α	MTE-1	<i>mitochondrial thioesterase-1</i> ; thioestérase mitochondriale 1
	UCP2	<i>uncoupling protein 2</i> ; protéine de découplage 2
	UCP3	<i>uncoupling protein 3</i> ; protéine de découplage 3
Coactivateurs de PPAR α	SRC-1	<i>steroid receptor coactivator-1</i> ; coactivateur 1 du récepteur stéroïdien
	CBP/p300	<i>CREB (cAMP-response element-binding protein) binding protein</i> ; protéine de liaison interagissant avec CREB (protéine élément de réponse se liant avec AMPc
	PBP/ TRAP220	<i>presenilin-binding protein / thyroid hormone associated protein 220</i> protéine de liaison à la préséniline / protéine 220 associée à l'hormone thyroïdienne
	PGC-1	<i>peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1</i> ; coactivateur 1 du récepteur au facteur activé de prolifération des peroxyosomes

Tableau 1. Protéines cibles et coactivateurs de PPAR α . ^{146 170 81 80 240 41 237 275 83 131 176}
274

PPAR α se lie à RXR (récepteur rétinolde X; hétérodimérisation activant PPAR α) pour se fixer ensuite au PPRE (élément de réponse de la prolifération des peroxyosomes). Les coactivateurs de PPAR α se lient au complexe ainsi formé pour stimuler la transcription génique des protéines cibles via l'activité de HAT qui augmente l'acétylation des histones et donc améliore l'accès à l'ADN. L'élément de réponse de PPAR α pour MCAD est NRRE-1 et pour CPT1 β est FARE-1 (élément de réponse 1 aux acides gras) ^{79 268 41}.

Le tableau 1 présente les principales protéines cibles de PPAR α ainsi que les coactivateurs de ce dernier. PPAR α lui-même est contrôlé par sa phosphorylation par ERK (kinase régulée par des signaux extracellulaires) qui l'inactive²³.

PPAR β/δ (récepteur bêta/delta au facteur activé de prolifération des peroxysomes) sont ubiquitaires mais particulièrement exprimés dans le cœur. Ils ont plusieurs gènes cibles en commun avec PPAR α . Ils augmentent l'expression de GLUT4 et des gènes de la β -oxydation des acides gras et de la glycolyse (PFK-1, CPT1, MCAD)^{146 180 22}.

1.4.2.1 Transport membranaire des acides gras

Les acides gras libres dans le sang sont liés avec l'albumine, tandis que les TAG sont sous forme de chylomicrons ou de VLDL (lipoprotéines de très faible densité)^{86 250 239}. La vitesse d'entrée des acides gras dans la cellule est déterminée principalement par leur concentration plasmatique. Les LCFA entrent dans la cellule par les transporteurs protéiques FATP (FATP6 est la primaire dans le cœur) ou par les translocases FAT/CD36 responsables de 50-60% du transport (déterminée par des études de délétions/inhibitions)^{137 205 6 132 147}. Ils sont normalement présents dans les endosomes et subissent une translocation à la membrane du sarcolème sous l'influence de l'insuline et de la contraction (via l'action de l'AMPK). L'accumulation d'acides gras dans la cellule augmente l'ubiquitination des FAT/CD36 et leur dégradation (rétrocontrôle)^{132 146}. Dans le cytosol, les LCFA sont transportés par des FABP pour être ensuite estérifiés/activés par les LCAS (acyl CoA à longue chaîne synthétase) en acyl CoA à longues chaînes afin d'être transportés dans la mitochondrie ou être transformés en TAG³⁷. Une proportion de 75% de tous ces acides gras libres entrés dans la cellule sont immédiatement utilisés, la balance est métabolisée en TAG^{261 146}. Les TAG sont scindés par la lipase en glycérol et acides gras. Ce processus de lipolyse est amplifié par l'adrénaline, la noradrénaline, le cortisol, la somatomédine, les

hormones thyroïdiennes, et diminué par l'insuline ²³². La figure 7 suivante résume les mécanismes d'entrée et de métabolisme cytosolique des acides gras et TAG.

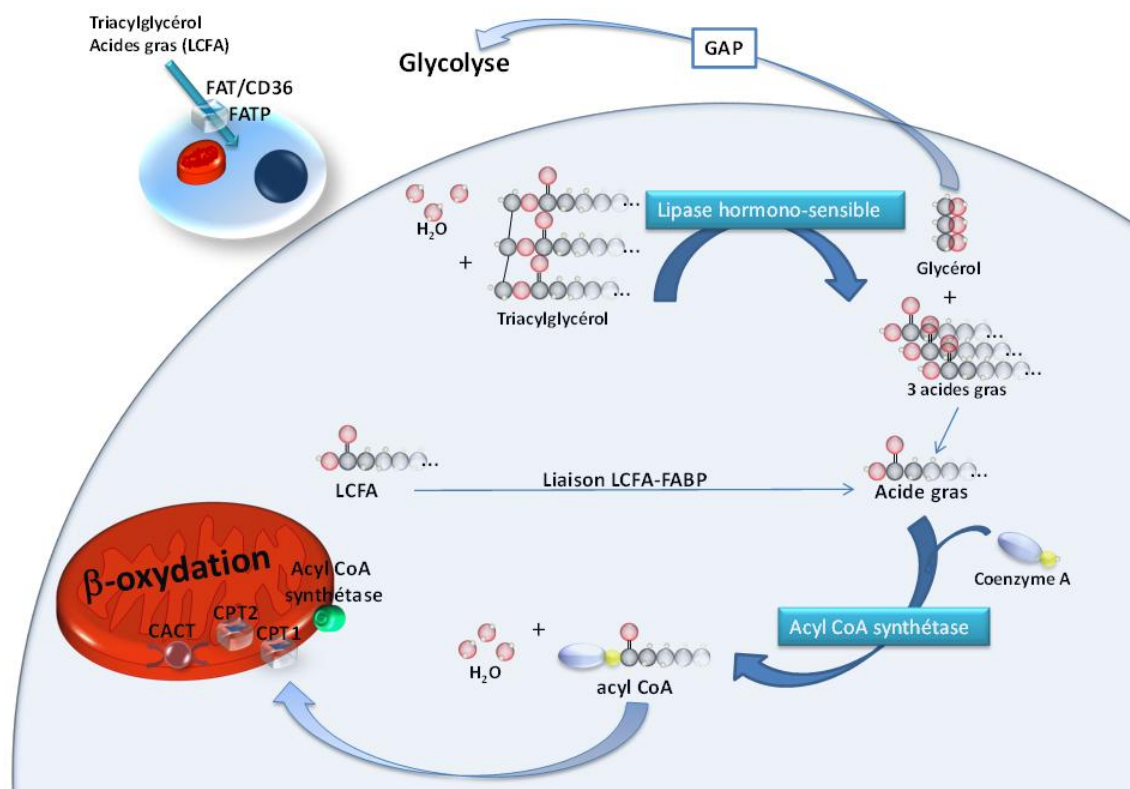


Figure 7. Transport membranaire des acides gras et TAG et formation d'acyl CoA intracellulaire. Les acides gras et TAG entrent dans la cellule par les FAT/CD36 et les FATP. Les TAG sont métabolisés en glycérol (utilisé dans la glycolyse) et en acides gras. Les LCFA sont transportées dans le cytosol par des FABPs. Les acides gras sont estérifiés en acyl CoA par des acyl CoA synthétase. Ces derniers seront transférés à l'intérieur de la mitochondrie vers la β-oxydation par le système CPT1-CACT-CPT2.

1.4.2.2 Transport mitochondrial de l'acyl CoA à longue chaîne

Les acyl CoA à longues chaînes ne peuvent diffuser seuls à travers la membrane mitochondriale et sont donc dépendants d'une amine quaternaire largement distribuée qu'est la carnitine, et d'un complexe CPT1-CACT-CPT2 décrit à la figure 8 ¹³. Les acides gras de moins de 10 carbones sont oxydés indépendamment de ce système de transport mitochondrial passant librement à travers la membrane mitochondriale

^{179 13}. En présence de SCFA, comme le butyrate, le transport mitochondrial des LCFA comme le palmitate est diminué ¹⁷⁹.

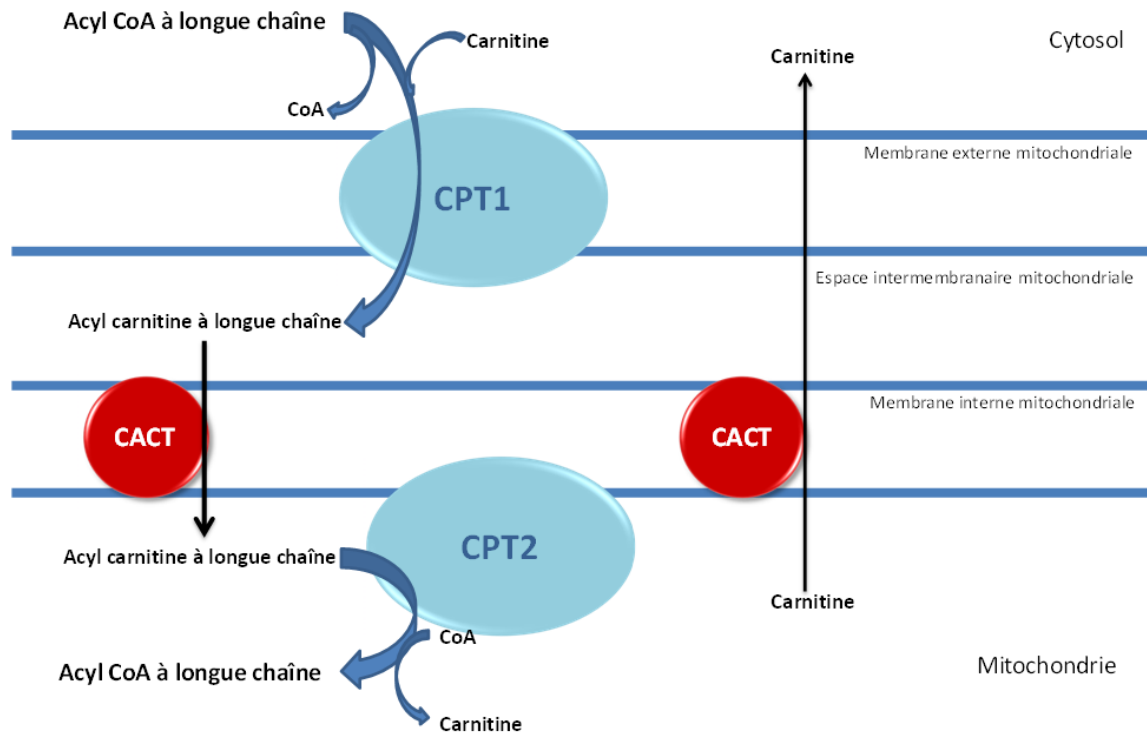


Figure 8. Transport des LCFA du cytosol vers l'intérieur de la mitochondrie par le système CPT1-CACT-CPT2. La région acyle des acyl CoA à longues chaînes est transférée à un carnitine par transestérification libérant le CoA dans le cytosol. L'acyl carnitine ainsi formé est transloqué dans la mitochondrie par le CPT1 et le CPT2. L'acyl carnitine va ensuite perdre son groupement acyle qui se lie alors à un CoA intra-mitochondrial, le carnitine libéré rejoignant les concentrations cytosoliques par le transporteur de carnitine (CACT) ²⁵⁰.

L'inhibition de CPT1 par le malonyl CoA (produit de la glycolyse) prévient l'entrée des acides gras à longues chaînes dans la mitochondrie résultant en une faible capacité d'oxydation des acides gras ¹⁸⁰. La phosphorylation de CPT1 empêche son inhibition par le malonyl CoA et ainsi favorise son activité catabolique (*in vitro*) ^{127 180}. CPT1 est activé par la phosphorylation par PKA alors qu'il est inhibé par celle de CAMKIII (calmoduline kinase de type 3). Il existe 2 isoformes de CPT1 : α et β . CPT1 α est presque ubiquitaire (pas dans les adipocytes ni le muscle squelettique) tandis que

CPT1 β est exprimé dans le muscle squelettique, les adipocytes, et le cœur. L'activité de CPT1 α est principalement contrôlée par l'action des hormones tandis que CPT1 β est régulé principalement par les concentrations d'acides gras intracellulaires^{44 137 63 266 137}. CPT1 α est beaucoup moins sensible à l'inhibition par malonyl-CoA que CPT1 β . CPT1 α est l'isoforme fœtale tandis que CPT1 β est l'isoforme adulte du cœur représentant 90% des CPT1 à cet âge^{45 137}.

Chez le rat, les changements de l'expression génique du métabolisme énergétique suivent la disponibilité des nutriments durant la période périnatale. En effet, une disponibilité en acides gras augmentée en concomitance avec une baisse de glucose peut influencer l'oxydation cardiaque des acides gras. Dans ces circonstances, les effets des facteurs qui affectent le contenu en malonyl-CoA sont alors diminués favorisant ainsi la voie métabolique lipidique dans les cardiomyocytes¹³⁷. Les CPT1 α (CPT1 $_{liver}$) et CPT1 β (CPT1 $_{muscle}$) sont beaucoup exprimés avant la naissance et augmentent encore plus à la naissance^{29 137}. CPT1 α est responsable de 60% du transport des acyl CoA en prénatal pour ne correspondre qu'à 4% à l'âge adulte dans les cœurs de rat^{113 29 45 182 137}. Il y a une apogée d'expression de CPT1 β durant les 4 premiers jours postnatal dû au lait maternel riche en acides gras¹³⁷. Après la 2^e semaine de vie, CPT1 α diminue en-dessous des niveaux de CPT1 β ¹³⁷. Il y a augmentation d'utilisation des LCFA en postnatal attribuée à une hausse des niveaux de carnitine qui permet un plus grand niveau de saturation de substrats pour CPT1 spécialement CPT1 α ^{45 137}. CPT2 est une protéine de 70 kDa qui reconvertit l'acyl CoA à longue chaîne et qui est moins sensible à l'inhibition par le malonyl CoA que le CPT1¹⁴⁶.

1.4.2.3 β -oxydation intra-mitochondriale

La β -oxydation, ou hélice de Lynen, est une suite de réactions enzymatiques en spirale qui produit à chaque tour un acide gras avec 2 carbones en moins, un NADH, un

FADH₂, un acétyl CoA ¹³. Cette spirale est composée de 4 étapes: oxydation, hydratation, seconde oxydation et thiolys(e). Chacune des enzymes de la β -oxydation est inhibée par son produit de réaction, ainsi que le NADH, le FADH₂, et dans le cas de la KT par l'acétyl CoA ¹⁴⁶. Les acides gras à nombre de carbones pair entrent sans difficulté dans la β -oxydation et sont dégradés complètement après plusieurs tours. Les acides gras à nombre de carbones impair provenant des plantes et organismes marins sont dégradés pour former au dernier tour un propionyl-CoA étant transformé ensuite en succinyl CoA. Ce dernier devient un substrat au cycle de Krebs. La figure 9 suivante présente les étapes de la β -oxydation des acides gras.

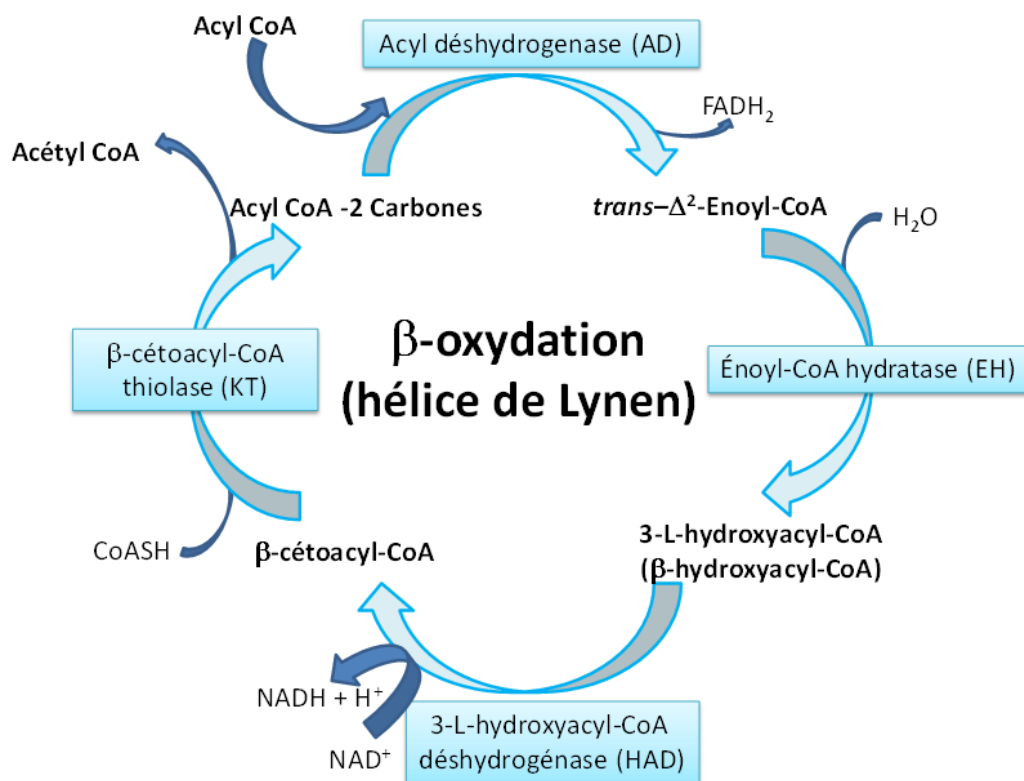


Figure 9. Schéma de la β -oxydation des acides gras. L'acyl déshydrogénase (AD), forme du *trans*- Δ^2 -Enoyl-CoA et libère un FADH₂ à partir d'un acyl CoA. La double liaison formée à l'étape précédente est hydratée par l'énoyl-CoA hydratase (EH) pour former du 3-L-hydroxyacyl-CoA (β -hydroxyacyl-CoA) en utilisant un H₂O. Le β -hydroxyacyl-CoA est ensuite déshydrogéné et oxydé par la 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HAD) en réduisant un NAD⁺ en NADH⁺ + H⁺ et formant du β -cétoacyl-CoA. La dernière étape fait intervenir une thiolase, la β -cétoacyl-CoA thiolase (KT), afin de briser la liaison entre les carbones α et β , en collaboration avec un groupement CoASH. Cette réaction produit un acétyl CoA et un acyl CoA avec 2 carbones en moins que celui d'origine.

Les mitochondries possèdent 4 types d'AD catalysant la première étape de la β -oxydation se différenciant entre elles par la longueur des chaînes hydrocarbonées de leur substrat. Ainsi on retrouve la VLCAD (12 à 18 carbones), LCAD (10 à 12 carbones), MCAD (6 à 10 carbones), SCAD (4 à 6 carbones). Une déficience en MCAD, résultant en un déséquilibre entre l'oxydation des glucoses et des acides gras, est présente chez 10% des nouveau-nés. Il a été proposé que cette déficience pourrait être en partie responsable du syndrome de la mort subite du nourrisson^{250 1}. Les substrats de la β -oxydation ont aussi leur forme spécifique des enzymes EH, HAD et KT selon la longueur de leur chaîne hydrocarbonée. Par exemple, les LCFA sont pris en charge par leurs enzymes spécifiques : LCEH, LCHAD, LCKT¹⁷¹. Ces 3 dernières enzymes sont regroupées en complexe protéique octamérique trifonctionnelle mitochondriale (MTP) possédant des sous-unités α et β ($\alpha_4\beta_4$) : LCEH et LCHAD se retrouvent dans les sous-unités α tandis que LCKT est dans les β ²⁵⁰. Une corrélation a été démontrée entre un défaut des enzymes de la β -oxydation des acides gras à longues chaînes et une augmentation de la morbidité foétale comprenant la prématurité et la RCIU¹⁸⁰. Les VLCFA (acide gras à très longue chaîne hydrocarbonée avec plus de 22 carbones) sont métabolisés par les peroxysomes afin de former des substrats plus courts (produits acyl esters de CoA) pour la β -oxydation mitochondriale²⁵⁴.

1.4.3 Cycle de Krebs et Phosphorylation oxydative

Le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative sont des mécanismes énergétiques communs aux voies de la glycolyse et de la β -oxydation, débutant avec l'utilisation de l'acétyl CoA, molécule carrefour formée par ces 2 voies. L'acétyl CoA, par contre, a 2 destins: soit être utilisé dans le cycle de Krebs comme spécifié, soit être transformé en corps cétoniques (acétoacétate/ β -hydroxybutyrate/acétone) lorsque la concentration en oxaloacétate est faible.

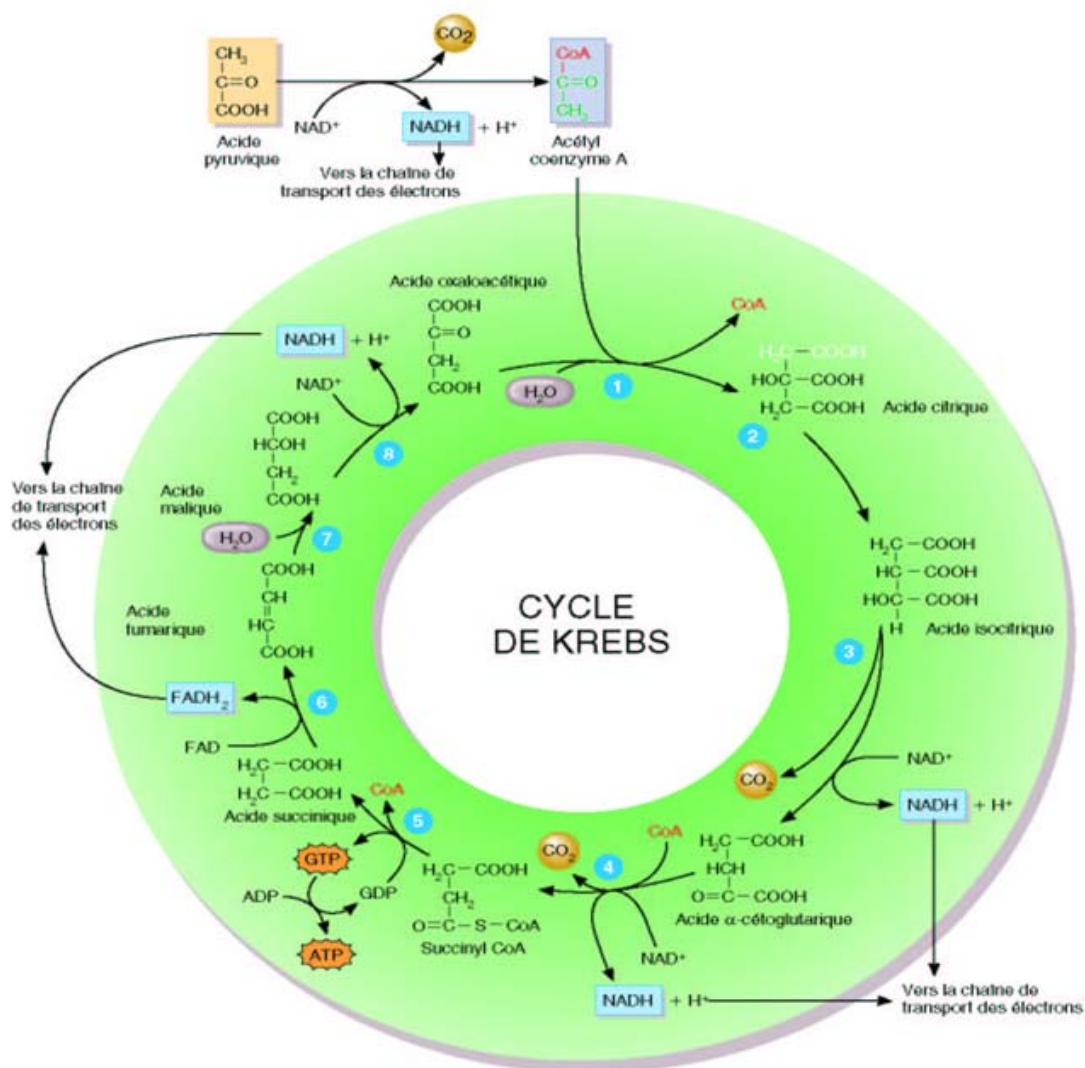


Figure 10. Vue d'ensemble du cycle de Krebs

Adapté de Tortora G.J., 2001²³²

L'acétyl CoA ajoute son fragment à 2 carbones à l'oxaloacétate pour former du citrate (acide citrique) dégageant le groupement coenzyme CoA grâce à la citrate synthétase. Le citrate est déshydraté par une lyase *cis*-aconitase en *cis*-aconitate en formant un H_2O . Ce dernier est converti en son isomère l'isocitrate (acide isocitrique) grâce à une hydratation par l'aconitase utilisant une molécule de H_2O . L'isocitrate est ensuite oxydé par l'isocitrate déshydrogénase en oxalosuccinate, réduisant un NAD^+ en NADH et H^+ , réaction nécessitant un ion Mn^{2+} ou Mg^{2+} . L'oxalosuccinate est décarboxylé en α -cétoglutarate (acide α -cétoglutarique) par l'isocitrate déshydrogénase dégageant un CO_2 , un NADH et un H^+ . L' α -cétoglutarate subit une décarboxylation oxydative par le complexe multienzymatique (5 coenzymes en succession: le thiamine pyrophosphate (TPP), le lipoate, le NAD, le CoA, le FAD) α -cétoglutarate déshydrogénase en succinyl CoA en liant un CoA, réduisant un second NAD^+ en NADH et H^+ , dégageant un second CO_2 . Le succinyl CoA est transformé en succinate (acide succinique) par la succinate thiokinase délogeant la CoA et formant un GTP (guanosine triphosphate) (un ATP par extension). La succinate est oxydé en fumarate (acide fumarique) par la succinate déshydrogénase formant un FADH_2 à partir du FAD. Le fumarate est hydrolysé en malate (acide malique) par la fumarase en utilisant un H_2O . Pour terminer le malate est oxydé par l'oxydoréductase malate déshydrogénase afin de reformer de l'oxaloacétate (acide oxaloacétique) en réduisant un NAD^+ en NADH et H^+ .

Le cycle de Krebs se compose de 8 étapes par tour (figure 10). Ce cycle de Krebs est contrôlé majoritairement par la disponibilité des substrats. De plus, les enzymes de ce cycle sont inhibées par leurs produits et autres intermédiaires du cycle, plus particulièrement l'acétyl CoA, l'oxaloacétate et le NADH²⁴⁸. Le cycle de Krebs à chaque tour produit 2 CO₂, 3 NADH, 1 FADH₂ et 1 GTP (par extension 1 ATP)¹³. Ces 2 derniers entreront dans la chaîne respiratoire mitochondriale utilisant à la fois des ions H⁺ et réduisant l'ADP en ATP. Les concentrations de citrate reflètent le statut lipidique tissulaire.

La chaîne de transport d'électrons mitochondriale (chaîne respiratoire) comporte 9 éléments (protéines et coenzymes) passant de l'état oxydé à réduit, regroupés en 5 complexes (figure 11). Les 4 premiers complexes I à IV interviennent dans le transport des électrons en expulsant des ions H⁺ dans l'espace intermembranaire mitochondrial créant un gradient de pH tandis que le dernier complexe V est responsable de la synthèse d'ATP.

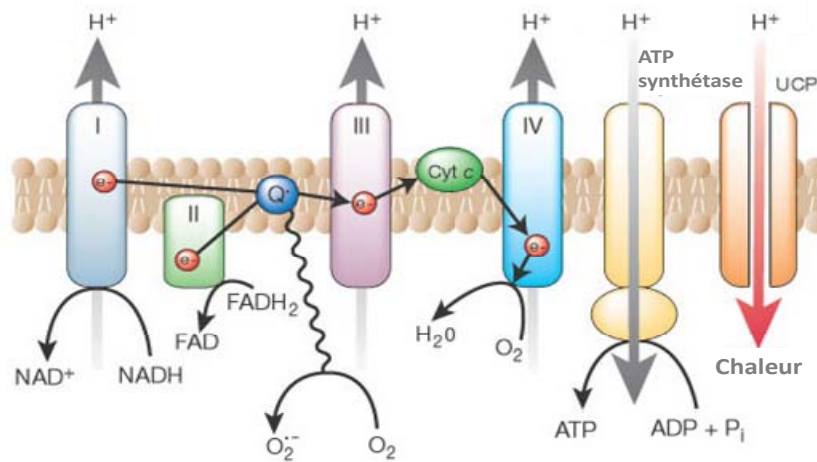


Figure 11. Chimiosmose entre la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative.

Adapté de Brownlee M., 2001⁴⁶

Le complexe I est la NADH-ubiquinone réductase et est composé de la flavinmononucléide (FMN) et d'une protéine Fe-S (contenant du soufre et du fer fermement liés). Le complexe II est la succinate-ubiquinone réductase et est composé d'une FAD et d'une protéine Fe-S. Le complexe III est l'ubiquinone-cytochrome C réductase et est formé des cytochromes *b* et *c*₁ et d'une protéine Fe-S. Le complexe IV est la cytochrome oxydase formée des cytochromes *a* et *a*₃. Le complexe V est l'ATP synthétase. La coenzyme Q et le cytochrome c lient respectivement les complexes I à III et III à IV ensemble. Le dernier cytochrome *a*₃ du complexe IV cède ses électrons à l'oxygène ($\frac{1}{2} O_2$) et forme du H_2O en recueillant une paire de protons du milieu aqueux environnant. Les UCPs en faisant passer un H^+ dans son port dégage de l'énergie essentielle au fœtus et au nouveau-né. Le NADH et le H^+ cèdent leurs électrons au FMN du complexe I tandis que le $FADH_2$ cède ses électrons à une protéine Fe-S du complexe III et donc génère moins d'énergie par extension que le NADH. Le complexe V (ATP synthétase) utilise le gradient électrochimique intermembranaire des protons pour synthétiser de l'ATP. Les H^+ entrent dans le canal de l'ATP synthétase en direction de l'intérieur de la mitochondrie et par une force protomotrice génèrent une phosphorylation de l'ADP en ATP; on estime la nécessité de 3 protons entrants pour former un ATP²⁴⁹.

L'ATP formé par ces complexes en chimiosmose sort de la mitochondrie par un antiport se dirigeant vers le cytosol. L'ADP entre dans la mitochondrie par ce même antiport. Dans le cœur adulte normal, la réserve d'ATP du myocarde est changé/utilisé au complet toutes les 10 secondes¹⁴⁶. Le tableau 2 démontre les différences quant à la production énergétique selon le substrat glucidique ou lipidique utilisé.

Substrat	Type de Substrat	Apport énergétique total (par mole de substrat)
Palmitate (acide palmitique)	Acide gras saturé (16 C)	129 ATP
Stéarate (acide stéarique)	Acide gras saturé (18 C)	146 ATP
Oléate (acide oléique)	Acide gras monoinsaturé (18 C)	144 ATP
Glucose du glycogène	Glucide	39 ATP + 1684 kJ en aérobie
Glucose libre	Glucide	38 ATP + 1694 kJ en aérobie 2 ATP + 122 kJ/mol en anaérobie

Tableau 2. Bilan global de production énergétique selon le substrat utilisé.

La phosphorylation oxydative requiert un apport continu en oxygène par la circulation coronaire, en protons et électrons provenant du cycle de Krebs et en ADP transportés du cytosol à la mitochondrie par des translocases¹³. À la période prénatale, l'activité des enzymes du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale est faible reflétant l'immaturation fonctionnelle mitochondriale dans le myocarde fœtal. Cette activité augmente considérablement durant les 48 premières heures postnatales dans le foie et le cœur de rat^{258 13 104}. D'ailleurs, chez le rat, l'activité des complexes I à III de la chaîne respiratoire mitochondriale commence à augmenter dans le cœur et le foie durant le développement fœtal du jour E16 à terme¹³³. L'activité du complexe III de ces cœurs augmente de trois fois de la naissance au jour 25 *postpartum* et devient constante par la suite¹³³.

1.5 Insuffisance cardiaque et cardiomyopathie

Les conditions pathologiques à l'âge adulte sont causées par des prédispositions génétiques et des facteurs de risque dus au style de vie après la naissance. Plusieurs études ont démontré qu'à ces causes s'ajoutait l'environnement fœtal défavorable. Ce dernier serait responsable d'altérations en état de dormance situées à divers niveaux jusqu'à ce qu'un stimulus à l'âge adulte déclenche leur réexpression^{136 88 230}. Dans le modèle utilisé au laboratoire où une diète faible en sodium pendant la gestation induit

une RCIU, un remodelage cardiaque caractérisé par une augmentation du volume des cardiomyocytes a été observé chez la progéniture femelle à l'âge adulte ³¹. Plusieurs conditions pathologiques cardiaques de l'âge adulte sont caractérisées par des altérations du métabolisme énergétique. Cette section permettra de les mettre en relief.

La fonction cardiaque dépend de l'apport continu en énergie. Le cœur adulte dont le métabolisme ou l'hémodynamisme est touché, par exemple lors d'hypoxie, hypertension, ischémie du myocarde, hypertrophie, atrophie, cardiomyopathies diabétiques, revient à un profil d'expression génique fœtal ¹⁹⁴. En effet, plusieurs protéines cardiaques voient leur patron d'expression modifié au profit de leur isoforme fœtale. Le métabolisme cardiaque revient donc à son état fœtal avec une prédominance d'utilisation des hydrates de carbone en tant que source énergétique primaire ¹⁹⁴. Ce phénomène adaptatif est aussi présent lors d'hibernation myocardique ¹⁹⁴.

Le cœur en insuffisance démontre une dysfonction mitochondriale: baisse de la synthèse d'ATP, augmentation de la production des ROS, augmentation des dommages à l'ARNm (délétion, mutations ponctuelles), augmentation de la signalisation de mort cellulaire, augmentation des atteintes structurales ⁴⁷. Lors des stades précoces d'une atteinte cardiaque, il n'y a pas présence de mort cellulaire, donc il n'y a pas présence de marqueurs mitochondriaux. Par contre, il y a présence de dommages oxydatifs aux mitochondries qui ne sont détectables que lorsqu'on inflige un stress ultérieur ¹⁵⁵.

Durant l'hypoxie, HIF-1 α (régulée par l'O₂), faisant partie d'un complexe hétérodimérique avec HIF-1 β (constitutive), promouvoit l'activité glycolytique, en augmentant le transport du glucose dans les cellules ainsi que l'activité des enzymes glycolytiques. De plus, HIF-1 α réduit le pH du milieu de culture résultant dans

l'augmentation de l'apoptose cellulaire ^{181 210 148}. Une hausse de la concentration d'oxygène conduit à la voie d'ubiquitination pour la protéolyse d'HIF-1 tandis qu'une baisse de la concentration d'oxygène cause la dimérisation d'HIF-1 α et sa translocation au noyau. En normoxémie, la PDH inhibe HIF1 α . Durant l'hypoxie, les cellules transitent vers un mode métabolique glycolytique primaire par augmentation de la régulation des gènes glycolytiques HIF-1 (facteur 1 inductible par l'hypoxie) dépendants, comme GLUT1, PGK1 (phosphoglycérate kinase 1), HK1, HK2, etc ^{210 53 94}. Le cobalt mime l'effet de l'hypoxie sur HIF1 ¹⁸⁴. De plus, la diminution du pH intracellulaire comme résultat de l'accumulation d'acide lactique cause une accélération de la glycolyse ¹⁴⁸. Le cœur fœtal a une capacité, comparativement au cœur adulte, à fonctionner sous conditions d'insuffisance en oxygène; cette adaptation cardiaque fœtale est une « hypoxie physiologique » ¹³. D'ailleurs le sang fœtal est plus hypoxique que celui de l'adulte. De plus, le fœtus possède un métabolisme énergétique réduit comparativement à l'adulte puisqu'il n'a pas à dépenser de l'énergie pour se réchauffer ni pour assurer un apport sanguin aux poumons.

Dans les conditions pathologiques comme la surcharge pressive, une tension artérielle augmentée (hypertension) ou un infarctus du myocarde, les fibroblastes cardiaques prolifèrent, les cardiomyocytes s'hypertrophient en augmentant leur volume individuel ou meurent et les protéines de matrice extracellulaire s'accumulent disproportionnellement et excessivement ^{78 159 257}. L'accumulation de collagène I et III qui survient dans le cœur hypertrophié ou insuffisant, conduit au développement de la fibrose, élément important du remodelage cardiaque. Ce processus appelé fibrose réactive cardiaque mène à l'augmentation de l'épaisseur et de la masse ventriculaire, puis diastolique et systolique, pour amener l'hypertrophie cardiaque et la dysfonction cardiaque ^{159 118}. Une étude *in vitro* a démontré que l'hypertrophie cardiaque était associée avec une augmentation de production de ROS et une diminution de l'activité de l'aconitase ¹⁷³. Comme l'aconitase du cycle de Krebs est extrêmement sensible aux ROS, sa suppression peut servir, jusqu'à un certain point, de marqueur de stress

oxydatif et d'hypertrophie cardiaque ^{106 31}. De plus, l'hypertrophie diminue l'expression en ARNm des enzymes de la β -oxydation, dont MCAD, et le transport par CPT1 des LCFA car il y a baisse des L-carnitine disponible au transporteur ^{202 55 87}.

1.6 Mort cellulaire

Il existe deux types de mort cellulaire. Le premier est caractérisé par une implosion menant à la mort de cellules, infectées, touchées, dysfonctionnelles au profit de la survie des cellules saines environnantes. C'est l'apoptose. Le deuxième est caractérisé par une explosion du bagage enzymatique intracellulaire menant à la mort de la cellule touchée, affectant les cellules environnantes, les tuant ou altérant la matrice aux alentours par l'apparition d'une inflammation locale. C'est la nécrose.

a) Apoptose

L'apoptose est un processus clé durant l'organogenèse. Elle est impliquée dans le développement et la maturation morphologique des organes, à l'origine génétiquement programmés ^{5 3 190 236 263}. Cette apoptose physiologique est un processus important dans la maturation des cardiomyocytes, la morphologie des orteils et des doigts (espace interdigital) la maturation cérébrale et neuronale et la destruction des lymphocytes autoréactifs ou dysfonctionnels ^{5 3 190 236 263}. Le processus d'apoptose pathologique est enclenché dans les cardiomyocytes de mammifères, après une ischémie-reperfusion, ou lors d'une surcharge pressive ⁴³. Cette apoptose pathologique est également présent, au niveau cérébral, lors du processus dégénératif de la maladie d'Alzheimer.

Une perte inappropriée de cardiomyocytes à la période prénatale via l'apoptose résulte en une réduction permanente du nombre d'unités fonctionnelles dans le myocarde et mène à une variété de dysfonctions cardiaques chez l'enfant et l'adulte ^{105 120 269}. L'apoptose culmine en la formation de corps apoptotiques par extraposition de la membrane plasmique par zéïose (turgescence) à la suite de la condensation de la

chromatine à la périphérie du noyau, la cassure du cytosquelette, la dissolution de l'enveloppe nucléaire, la fragmentation de l'ADN comportant l'inactivation protéolytique de la polymérase poly-ADP-ribose par le groupe de protéases cystéines^{43 251}. L'apoptose prend 2 heures à s'achever et peut être prévenue par des inhibiteurs de la synthèse des cytokines (pentoxifylline), des antidépresseurs (sertraline) et un inhibiteur de la Cox-2 (cyclooxygénase-2)^{255 256}. Il existe 2 voies possibles d'apoptose menant toutes 2 à la voie des caspases: la voie extrinsèque (mort par commande extérieure) et la voie intrinsèque (mort par défaut en absence de signaux anti-apoptotiques)²²⁰.

Dans la voie d'apoptose extrinsèque, une molécule adaptatrice FADD (domaine de mort associé à Fas) se lie à Fas (fragment stimulant l'apoptose) par son domaine de mort et aux procaspase 8 et 10 par un autre domaine complémentaire DED (domaine effecteur de mort)^{172 220}. Ces liaisons ont pour effet d'activer le clivage de la procaspase 8 et 10 en caspase 8 et 10 permettant l'activation de Bid par son clivage (tBid). Ceci provoquera la translocation vers le cytosol de plusieurs facteurs mitochondriaux, dont le cytochrome c de la chaîne de transport d'électrons. Ce dernier le lie à l'Apaf-1 (facteur 1 activateur de peptidases apoptotiques) stimulant le clivage subséquent de la procaspase 3 en caspase 3 et son activation par le fait même conduisant à la catalyse des clivages protéolytiques induisant l'apoptose^{251 85}.

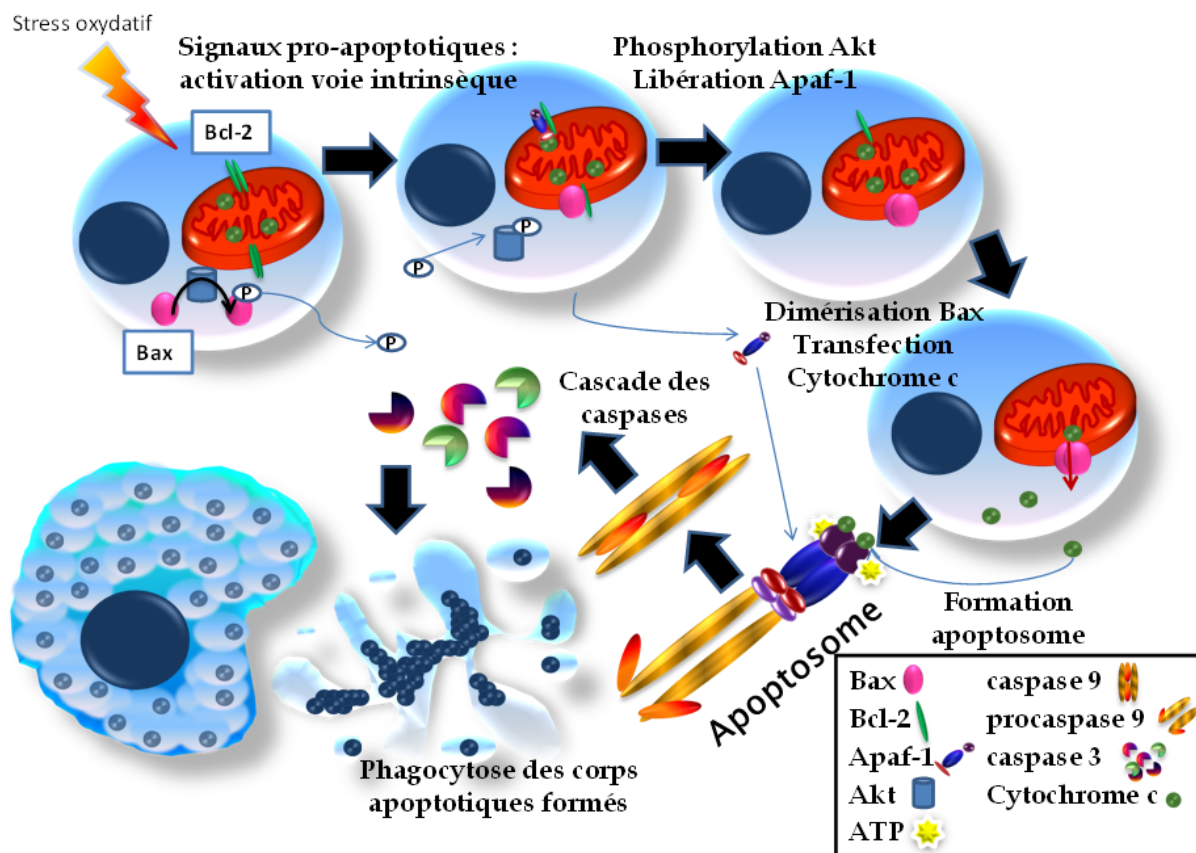


Figure 12. Voie intrinsèque de l'apoptose suite à une stimulation pro-apoptotique pouvant être induit par un stress oxydatif.

La voie intrinsèque, illustrée à la figure 12 ci-dessus, fait intervenir la famille des Bcl-2 comprenant 3 groupes: groupe I comprend des membres anti-apoptotiques [Bcl-2, Bcl-x_L], groupe II comprend des membres pro-apoptotiques [Bax, Bak], groupe III comprend des membres pro-apoptotiques [Bad, Bik, Bim, Bid, Blk]^{221 251}. Une étape cruciale avant que Bax (et autres membres proapoptotiques) puisse exercer son activité pro-apoptotique est sa translocation du cytosol à la mitochondrie permettant la formation d'un pore à travers la membrane mitochondriale externe et l'induction subséquente de la relâche cytosolique des molécules apoptogènes. Ces molécules relâchées dans le cytosol comprennent entre autres des cytochromes c, des caspases 2,3 et 9 et de l'AIF (facteur d'induction de l'apoptose)²⁶⁹. Ces protéines pro-

apoptotiques peuvent également activer l'ouverture des PTP qui affecte le potentiel transmembranaire mitochondrial. Cette perturbation induit un gonflement osmotique de la mitochondrie et sa rupture possible ⁷⁴. Par la suite, la formation d'un apoptosome avec la collaboration des cytochromes c, de l'ATP, d'Apaf-1 peut s'amorcer et recruter la procaspase 9 pour la cliver et la fixer. Cet apoptosome conséquemment activera la caspase 3 en la clivant de sa forme procaspase afin d'induire la mort cellulaire ⁷.

Dans le cœur fœtal de rat normal, à la fin de la gestation aucune apoptose n'est détectable mais à partir de la naissance et jusqu'à 21 jours d'existence, il y a présence d'apoptose des cardiomyocytes ¹²⁵. L'absence d'apoptose cardiaque prénatale est due à la forte expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui diminue rapidement lors des jours 1 à 5 en postnatal, puis remonte progressivement des jours 11 à 21 ¹²⁵. Bcl-2 et Bax sont exprimés chez le cœur du rat, de la souris et de l'humain ^{18 4 141 264 269}. L'hypoxie chronique diminue les niveaux de Bcl-2 dans le cœur fœtal de rat, sans affecter les niveaux de Bax mais avec une augmentation dans la forme active et clivée des caspases-3 et de leur activité ^{18 269}.

L'entrée intracellulaire de glucose et l'augmentation de l'activité de la glycolyse participent à la cardioprotection contre l'apoptose par la voie d'Akt/PKB dont les fonctions sont de promouvoir la survie cellulaire et bloquer l'apoptose ^{134 154}. Les cardiomyocytes fœtaux humains montrent de plus faibles taux d'induction d'apoptose suite à un stimulus à l'ischémie-reperfusion, à l'interleukine-6 recombinant et à la staurosporine comparativement aux mêmes cellules néonatales. Ces cellules possèdent donc un phénotype résistant à l'ischémie protégeant ainsi le cœur fœtal ⁶¹.

b) Nécrose

Comme énoncé plus tôt, la nécrose correspond à une explosion cellulaire suite à une atteinte par dommages infligés (physique/chimique). La cellule et ses organites

subissent un gonflement osmotique, leurs membranes abîmées permettant l'entrée accrue dans la cellule du milieu extracellulaire ²⁵¹. Les mitochondries sont floculentes et la chromatine se condense en amas. Par la suite, les enzymes lysosomiales digèrent les constituants intracellulaires. S'ensuit la lyse cellulaire dégageant le contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire affectant les cellules saines environnantes. Ce déversement contient des cytokines provoquant l'inflammation et le recrutement de cellules phagocytaires et macrophages afin de phagocyter les résidus cellulaires.

1.5 Hypothèse de travail et objectifs

La grossesse est parfois accompagnée de complications dont la RCIU. Malgré cette proportion importante d'enfants nés avec une RCIU, peu de renseignements sont disponibles à ce jour sur leur devenir et les conséquences de cette condition. Barker a étudié cette épineuse question pour élaborer sa théorie de programmation ^{24 25}. Par contre, la prédisposition au développement de conditions pathologiques à l'âge adulte, encourue par la RCIU, demeure à être confirmée expérimentalement. Le modèle RCIU développé au laboratoire causé par une diète faible en sodium chez le rat, est caractérisé par des changements subtils pouvant être retrouvés lors d'une RCIU idiopathique chez l'humain. La baisse de perfusion placentaire présente chez nos rates gestantes RCIU, attribuable à une diminution concomitante du diamètre des artères utérines, de l'expansion volumique et du poids des placentas, pourrait être à l'origine d'une multitude d'atteintes fœtales compensatoires. Notre hypothèse de travail est qu'à la suite de cette diminution de perfusion placentaire pouvant affecter l'apport nutritionnel maternel, le cœur fœtal s'adapterait en diminuant son métabolisme énergétique. De plus, cette adaptation cardiaque fœtale serait différente selon le sexe du fœtus.

L'objectif spécifique de cette étude est de dresser un profil métabolique général des cœurs fœtaux du modèle RCIU élaboré au laboratoire en étudiant sommairement les marqueurs de:

- 1) La voie des glucides en quantifiant les transporteurs de glucose membranaires et certaines enzymes de la glycolyse choisies pour leurs caractéristiques dites « limitantes » *in vitro*;
- 2) La voie des acides gras en quantifiant les transporteurs mitochondriaux d'acyl CoA.

L'atteinte du premier objectif sera possible en mesurant l'expression protéique par immunobuvardage de type Western des transporteurs de glucose membranaires GLUT1 et GLUT4 ainsi que des protéines enzymatiques limitantes de la glycolyse que sont l'hexokinase, la phosphofructokinase 1 et la pyruvate kinase. De plus, l'activité enzymatique de la dernière enzyme de la voie métabolique des glucoses sera quantifiée par colorimétrie. L'atteinte du second objectif sera possible en mesurant l'expression protéique par immunobuvardage de type Western des transporteurs mitochondriaux d'acides gras représentant la première étape limitante de la voie métabolique des lipides. Afin de vérifier l'homéostasie cardiaque et ainsi l'augmentation ou non d'apoptose, le ratio apoptotique des protéines Bax/Bcl-2, le clivage de la protéine caspase 3 seront quantifiés par immunobuvardage de type Western. Pour terminer, la protéine cytochrome c sera quantifiée en entier dans la cellule (cytosol et mitochondries lysées) par immunobuvardage de type Western car, jusqu'à un certain point, elle est indicatif de l'intégrité de la chaîne mitochondriale et de la présence d'hypoxie. Lors de cette étude du métabolisme cardiaque foetal visant les objectifs ci-haut mentionnés, la présence d'un dimorphisme sexuel sera considérée. Il a été démontré par le passé que le sexe de l'individu affectait les caractéristiques et capacités cardiaques. Il a d'ailleurs été avancé que ces effets de dimorphisme sexuel seraient dus entre autres à la présence d'œstrogène chez la femme. En effet, l'œstrogène inhibe la prolifération des fibroblastes et stimule la néovascularisation dans la bordure de la zone ischémique suite à un infarctus, limitant ainsi le remodelage pathologique du myocarde ²²⁴. L'œstrogène agit également en inhibant l'action de PPAR α sur le métabolisme lipidique et l'obésité à travers ses effets sur la régulation PPAR α -dépendante des gènes cibles de cette voie ²⁶⁷. D'autres études subséquentes

seront nécessaires afin de confirmer totalement l'hypothèse de départ puisque ces travaux ne dressent qu'un survol primaire des résultats attendus.

Ces altérations du métabolisme cardiaque fœtal pourraient être à l'origine de perturbations à long terme de l'hémodynamique du cœur pouvant conduire au développement de pathologies et insuffisances cardiaques. D'ailleurs, lors d'études antérieures sur notre modèle RCIU, il a été montré qu'il y avait présence d'un remodelage du ventricule gauche à l'âge adulte (12 semaines), chez la progéniture femelle seulement ³¹. En effet, les cœurs de ces rates montrent une plus grande expression en ARNm d'ANP et de l'isoforme auriculaire de la chaîne légère de la myosine et de plus bas niveaux protéiques de la Na⁺-K⁺-ATPase β 1 ³¹. Ces cœurs présentent également des cardiomyocytes plus larges, plus volumineux, avec une contractilité réduite, des sarcomères plus longs accompagnés d'une activité de l'aconitase diminuée ³¹.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Animaux

Les procédures expérimentales ont été révisées et approuvées par le comité institutionnel de protection des animaux local (CIBPAR : comité institutionnel des bonnes pratiques animales en recherche du Centre Hospitalier Université (CHU Sainte-Justine) lequel est accrédité par le conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Des rates Sprague-Dawley (*Charles-River Canada, St-Constant, Québec, Canada*) pesant de 225 à 250 grammes ont été accouplées avec des rats mâles fertiles. Le premier jour de gestation est déterminé par la présence de spermatozoïdes dans les frottis vaginaux. Les animaux sont hébergés dans un environnement contrôlé de lumière (6:00AM à 6:00 PM) et de température ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Les rates se voient assigner aléatoirement une des deux diètes pour les 7 derniers jours de gestation. Le premier groupe reçoit une diète normale contenant 0,2% de sodium (*diète basale 5755 ; PMI Feed, Ren's Feed and Supplies, Oakville, Ontario, Canada*) et de l'eau du robinet. Ces rates portaient les foetus contrôles. Le deuxième groupe reçoit une diète contenant 0,03% de sodium (*diète faible en sodium 5881 ; PMI Feed*) et de l'eau déminéralisée. Leurs foetus forment le groupe RCIU. Au 22^e jour de gestation (terme : 23 jours), les rates gestantes sont tuées par décapitation (entre 9h00 et 9h30). Le cœur de chacun de leurs foetus est prélevé. Les placentas RCIU sont réduits en dimensions et en poids. Les foetus RCIU sont plus petits avec des ratios pondéraux cœur au poids total et cerveau au poids total augmentés. Les tissus sont immédiatement gelés dans l'azote liquide et entreposés à -80°C jusqu'à leur usage.

2.2 Extraction protéique

Les tissus gelés (4 cœurs foetaux de 22 jours d'une même portée ≈ 75 à 100 mg) sont homogénéisés sur glace au polytron à vitesse maximale dans 1 ml de tampon de lyse Tris (50 mM Tris-HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0,25% sodium-deoxycholate, 1X pastille de cocktail inhibiteur de protéases sans EDTA (*Roche*,

Indianapolis, IN, États-Unis). L'homogénat est ensuite centrifugé à 12 000 g (11 300 RPM) à 4°C pendant 30 minutes et le surnageant est prélevé et conservé pour le dosage protéique. La même procédure est suivie pour les contrôles positifs de foie fœtal, cerveau fœtal, muscle de cuisse adulte, cerveau adulte, thymus et de placenta à 22 jours de gestation.

2.3 Dosage des protéines

La quantité de protéines dans le surnageant est déterminée à l'aide de la méthode de Bradford (kit Biorad) avec une dilution totale de 1/1000. La courbe standard pour ce dosage est effectuée à partir de différentes concentrations (en duplicata) de BSA (Albumine de Sérum Bovin conservé à -20°C) allant de 0 à 15 µg/mL.

À chacun des tubes, 200 µL de réactif Bio-Rad (*Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada*) est ajouté à l'aide de la pipette répétitive. Les tubes sont vortexés et ensuite la densité optique de chacun est prise à 570 nm par spectrophotométrie. Le surnageant des échantillons sont dilués d'un facteur 1:2 avec une quantité égale de tampon réducteur Laemmli 2X (*Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada : 1.25 mL 0.5M Tris-HCl, pH 6.8, 1.15 mL 20% SDS, 0.5 mL β-mercaptoéthanol, 1 mL glycérol, 6.1 mL H₂O, 2 mg bleu bromophénol*). Ces échantillons ont été bouillis 5 minutes, avant d'être conservés à -20°C jusqu'à utilisation pour électrophorèse et immunobuvardage de type Western.

2.4 Immunobuvardage de type Western

Les échantillons (conservés à basse température) de protéines de 10 portées différentes pour chacun des groupes (femelles RCIU et témoins, mâles RCIU et témoins) sont d'abord bouillis 5 minutes puis laissés sur la glace 5 minutes. Les

échantillons de protéines cardiaques fœtales (mâles et femelles RCIU et contrôles : quantité déposée dépendante de la protéine (voir tableau 3)) sont déposés sur un gel de SDS-polyacrylamide (5% pour le gel concentrateur : concentration du gel séparateur dépendante du poids de la protéine : voir tableau 3). Un marqueur de poids moléculaire « *Bench Mark Pre-Stained protein ladder* » (*Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada*) ainsi que des contrôles positifs sont déposés sur le gel. La séparation de ces protéines est faite par électrophorèse à 150 V pour le gel concentration et 200 V pour le gel séparateur dans un tampon de migration (0,025M de Tris, 0,192M de glycine, 0,1% SDS). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (*NitroPure, Osmonics Inc., Gloucester, MA, États-Unis*) pendant 1h00 à 10 V, entre 0,3 et 2,0 A, en utilisant du tampon de transfert semi-sec (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol, pH 8.3).

Les sites non-spécifiques de la membrane de nitrocellulose sont bloqués 1 heure à température pièce, sous agitation. Le blocage est possible par incubation avec un tampon salin phosphate (PBS ; 2,74 M NaCl, 53,66 mM KCl, 200,06 mM Na₂HPO₄, 35,27 mM KH₂PO₄, pH 7.4) -0,1% Tween 20 additionné soit de 5% d'Albumine de Sérum Bovin (*BSA : SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Allemagne*) ou de 5% de lait. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire (voir tableau 3), durant toute la nuit à 4°C, sous agitation (2 nuits pour CPT1β). Elle subit 5 lavages de 5 minutes, sous agitation, à température pièce, au PBS-Tween 20 0,1%. La membrane fût subséquemment incubée avec l'anticorps secondaire (voir tableau 3) durant 45 minutes, à température pièce, sous agitation. Elle subit de nouveau 5 lavages de 5 minutes, sous agitation, à température pièce, au PBS-Tween 20 0,1%.

Les bandes immunoréactives sont visualisées grâce à la trousse de détection de chimioluminescence Amersham ECLTM (*GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-*

Unis : RPN2108) et l'exposition de la membrane au film à chimioluminescence haute performance Amersham Hyperfilm™ ECL (*GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Unis : 28906839*). Les bandes immunoréactives sont quantifiées par le programme Alpha Imager (*Alpha Innotech Corporation*). Ces valeurs sont ensuite exprimées en unités densitométriques relatives à la GAPDH.

Protéine	Gel de séparation (%)	Quantité échantillon chargée (µg)	Agent bloquant	Anticorps primaire		Anticorps secondaire		Exposition
				Provenance	Concentration	Provenance	Concentration	
Bax	15	25	PBST-BSA 5%	Cell Signaling #2772	1:5000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	13 minutes
Bcl-2	15	25	PBST-BSA 5%	Cell Signaling #2876	1:2500	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	13 minutes
Caspase 3	15	25	PBST-lait 5%	Cell Signaling #9665	1:1000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	3 minutes (non-clivée) 13 minutes (clivée)
Cytochrome C	15	25	PBST-BSA 5%	Cell Signaling #4280	1:10 000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	15-30 secondes
GLUT1	12	80	PBST-lait 5%	Abcam ab15309	1:5000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	15 minutes
GLUT4	12	80	PBST-lait 5%	Cell Signaling #2213	1:500	Mouton ECL™ anti-IgG de souris couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA931V)	1:5000	1h30

HK 1	8	25	PBST-lait 5%	Abcam ab78420	1:50 000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	5-10 secondes
HK 2	8	25	PBST-lait 5%	Abcam ab78259	1:10 000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	1-2 minutes
PFK 1	8	25	PBST-lait 5%	Santa Cruz Biotechnology sc-166722	1:5000	Mouton ECL™ anti-IgG de souris couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA931V)	1:5000	2.5-5 minutes
PKM1/2	8	25	PBST-lait 5%	Cell Signaling #3186	1:1000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	10 minutes
CPT1 α	8	50	PBST-lait 5%	Santa Cruz Biotechnology sc-20669	1:5000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	45 minutes
CPT1 β	8	50	PBST-lait 5%	Santa Cruz Biotechnology sc-20670	1:1000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	20-40 minutes
CPT2	8	50	PBST-lait 5%	Santa Cruz Biotechnology sc-20671	1:10 000	Âne ECL™ anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase du raifort (GE Healthcare, NA934V)	1:5000	2 minutes

Tableau 3. Paramètres et conditions optimaux pour la réalisation d'électrophorèse et immunobuvardage de type Western des divers protéines d'intérêt.

La même technique est utilisée pour détecter la GAPDH du cœur foetal afin de déterminer la présence relative des protéines d'intérêt. Les membranes furent bloquées 1 heure à température pièce, sous agitation, au PBST-lait 5%. La concentration d'anticorps primaire monoclonal IgG₁ de souris anti-GAPDH (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, États-Unis : 6C5, sc-32233*) était de 1 : 50 000 dans du PBST-lait 5% et celle de l'anticorps secondaire de mouton ECL™ anti-IgG de souris couplé à la peroxydase du raifort (*GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Unis : NA931V*) 1 : 5000 dans du PBST-lait 5%. L'exposition de la membrane au film à chimioluminescence haute performance Amersham Hyperfilm™ ECL (*GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Unis : 28906839*) était de 10 secondes seulement.

2.5 Activité enzymatique de la pyruvate kinase par colorimétrie

L'activité de la pyruvate kinase a été effectuée selon le protocole de la compagnie Biovision (*Biovision Research Products, Mountain View, CA, États-Unis : #K709-100*). Le Standard Pyruvate à 1 nmol/μL est dilué et bien mélangé en ajoutant 10 μL du Standard à 990 μL du tampon d'essai. La préparation de 50 μL de **mélange de réaction** pour chaque puits est nécessaire selon la recette suivante :

	Mesure Pyruvate Kinase	Contrôle non-spécifique
	μL	μL
Tampon d'essai	44	46
Mélange substrat	2	---
Mélange enzyme	2	2
Amorce Oxired	2	2

Tableau 4. Composition de la réaction pour la mesure de l'activité de la pyruvate kinase selon le protocole du fabricant Biovision

La préparation des échantillons est effectuée en diluant le tissu (2 cœurs fœtaux) avec 4 volumes de tampon d'essai. Ce mélange est ensuite centrifugé pour obtenir des extraits clairs et 50 μL d'échantillon est déposé par puits (plaque de 96 puits). Une courbe standard de 0 à 10 nmol pyruvate/puits est effectuée. Pour les puits de contrôle positif, 5 μL /puits de solution de contrôle positif est complété de 45 μL /puits avec le tampon d'essai. Tous les tests d'échantillons sont effectués en duplicatas/triplicatas pour assurer une lecture dans un intervalle linéaire. Pour terminer, 50 μL de mélange de réaction est déposé dans chaque puits contenant le standard pyruvate, les échantillons et les contrôles. Il est nécessaire de bien remuer et enlever les bulles pouvant fausser la lecture de densité optique.

La densité optique est mesurée à 570 nm au départ et à T_2 (temps 2) après incubation de la réaction à 25 °C pour 10-20 minutes pour lire A_2 (absorbance 2) du pyruvate oxydé. La plaque est protégée de la lumière. L'augmentation de signal est due au pyruvate généré par la pyruvate kinase et oxydé par la pyruvate oxydase, $\Delta A = A_2 - A_1$. Pour le calcul de l'activité enzymatique, il est nécessaire de soustraire les lectures des valeurs de fond des standards et des échantillons. Une fois la courbe standard du pyruvate tracée, il faut appliquer le ΔA (différence

d'absorbance) à la courbe standard pour obtenir B nmol de pyruvate généré entre T₁ et T₂ par PK dans les puits de réaction. Le calcul de PK est effectué ainsi:

$$PK_{\text{Activité}} = \frac{B}{(T_1 - T_2) \times V} \times \text{facteur de dilution de l'échantillon} = \text{nmol/min/mL} = \text{mU/mL}$$

B = quantité de pyruvate de la courbe standard (en nmol)

T₁ = temps de la première lecture (A₁) (en min)

T₂ = temps de la deuxième lecture (A₂) (en min)

V = volume de l'échantillon ajouté au puits de réaction (en mL)

Une unité d'activité de pyruvate kinase est la quantité de transfert par l'enzyme de groupe phosphate du PEP à l'ADP, avec un rendement de 1.0 µmol de pyruvate par minute à 25 °C.

2.6 Analyse Statistique

La photodensitométrie relative de chacun des échantillons fût mesurée pour la GAPDH et les protéines d'intérêt (Caspase 3 clivée/non-clivée, Bax, Bcl-2, cytochrome C, PFK1, PKM1/2, HK1, HK2, CPT1α, CPT1β, CPT2). Ces valeurs sont exprimées en moyenne ± erreur type de la moyenne (*Standard error mean* ; S.E.M.). Les résultats d'expression protéique et d'activité enzymatique furent comparées en utilisant un test ANOVA (analyse factorielle de variance) à 2 critères de classification, soient le sexe et la présence/absence d'une RCIU, calculé par le logiciel Graph Pad PRISM (*Graph Pad Prism version 4.00 pour Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, États-Unis, www.graphpad.com*). Le post-test Newman-Keuls est utilisé sauf dans le cas d'interaction entre les facteurs; dans ce cas, un test t de Student est utilisé comme post-test. Une probabilité P ≤ 0,05 fût assumée comme statistiquement significative.

3. Résultats

3.1 MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE DES GLUCIDES

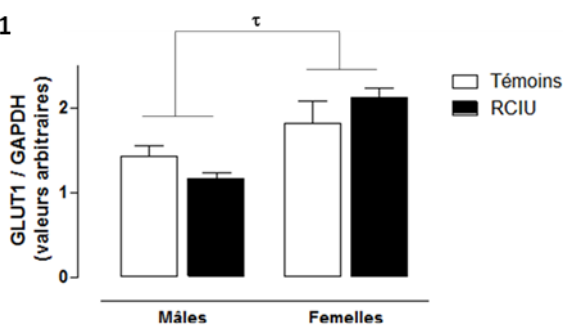
3.1.1 Expression protéique du transport du glucose et des enzymes limitantes

La première étape de la voie glycolyse dans les cellules cardiaques est l'entrée de glucose intracellulaire. Celle-ci est possible principalement par l'action des protéines GLUT1 et GLUT4^{234 217 34 119 278 215}.

A) Gel représentatif



B) Transporteur GLUT1



C) Transporteur GLUT4

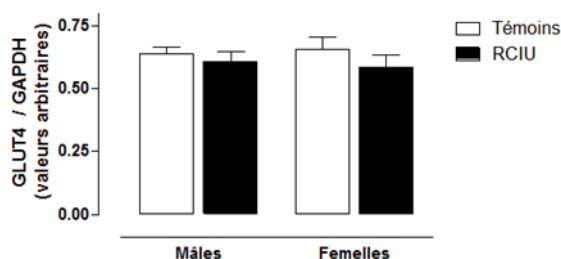


Figure 13. Expression protéique des transporteurs membranaires de glucose GLUT1 et GLUT4 dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU. A) Un gel représentatif d'immunobuvardage de type Western. Chaque représentant de chaque groupe est représenté au-dessus de leur colonne respective. B) et C) Histogramme illustrant l'expression protéique de GLUT1 et GLUT4 respectivement. Les barres noires correspondent aux groupes RCIU tandis que les barres blanches, aux groupes témoins. Les valeurs de densitométrie obtenues sont reportées sur l'expression relative de la protéine GAPDH. Les résultats sont exprimés moyenne \pm SEM (n=10 portées par groupe; n=1 correspond à 4 cœurs fœtaux de même sexe d'une même portée). τ $p < 0.001$ ANOVA 2 facteurs, effet du sexe.

Tel qu'illustré à la figure 13B et C, il n'y a pas de différence significative entre les groupes RCIU et témoins quant à l'expression totale des protéines. Nous voyons que l'expression protéique de GLUT1 (figure 13B) est plus élevée chez les femelles que chez les mâles (Anova 2 facteurs, $p < 0.001$). Cependant, le test *post-hoc* ne permet pas de déterminer un seuil significatif groupe par groupe. Dans le cadre de cette étude, le recrutement des GLUT4 à la membrane plasmique n'a pas été vérifié. En effet, seule la quantité protéique totale a été considérée reflétant la capacité de transport maximale de cette protéine. Cependant, une étude approfondie est nécessaire afin de vérifier l'effet de la RCIU sur le transport de glucose. En effet, la mesure directe du transport membranaire ainsi que la translocation membranaire des GLUT4 devront être quantifiées.

Le glucose une fois dans la cellule entre dans la voie de la glycolyse afin de former du pyruvate. Cette voie est contrôlée en partie par l'expression et l'activité d'enzymes dites « limitantes » *in vitro* : hexokinase 1, hexokinase 2, phosphofructokinase 1, pyruvate kinase M1/2. L'expression protéique de ces enzymes reflète de façon générale l'état capacitaire du métabolisme des glucides sans donner d'indication sur sa fonctionnalité^{149 247}.

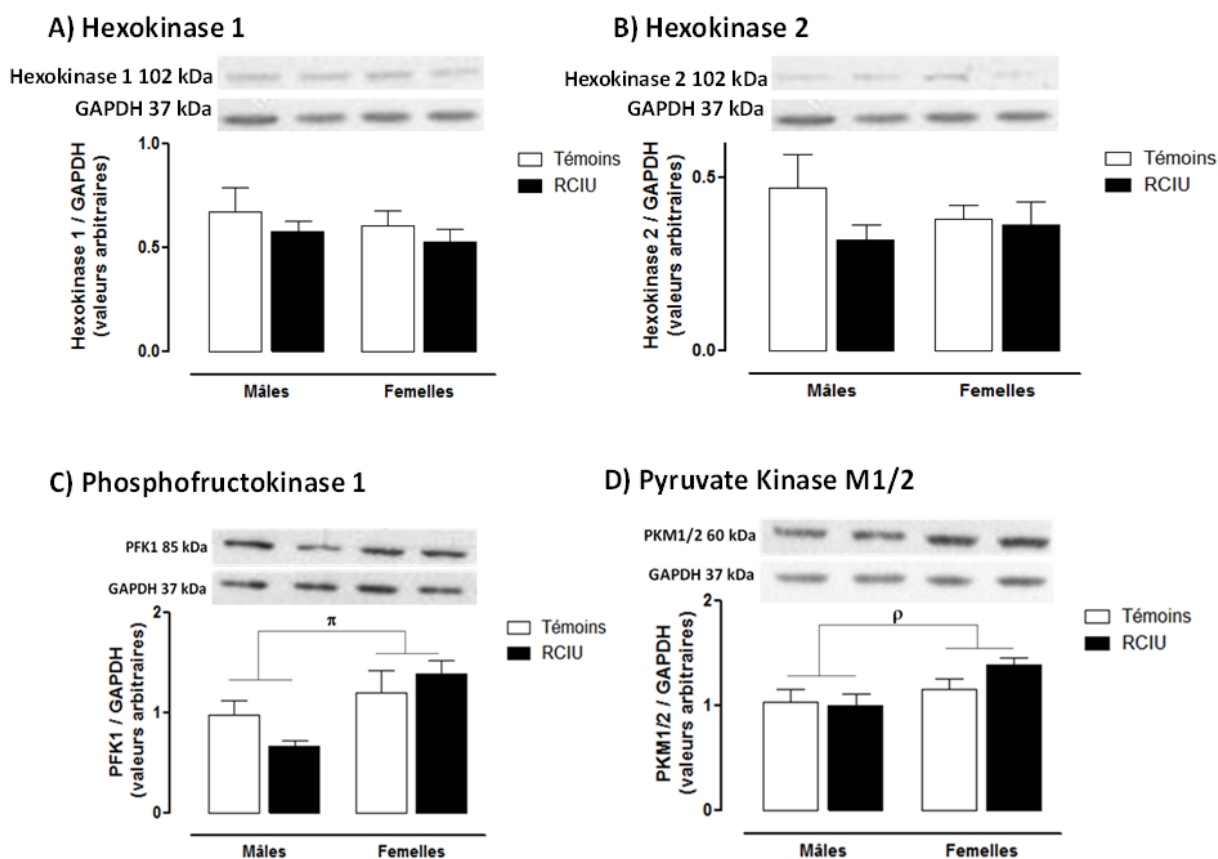


Figure 14. Expression protéique des enzymes limitantes déterminantes de la voie métabolique de la glycolyse, dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU. A), B), C) et D) Histogramme illustrant la l'expression protéique de hexokinase 1, hexokinase 2, phosphofruktokinase 1 et pyruvate kinase M1/2 respectivement. Une illustration d'un gel représentatif d'immunobuvardage de type Western est présente au-dessus de chacun des histogrammes. Chaque représentant de chaque groupe est représenté au-dessus de leur colonne respective. Les barres noires correspondent aux groupes RCIU tandis que les barres blanches, aux groupes témoins. Les valeurs de densitométrie obtenues sont reportées sur l'expression relative de la protéine GAPDH. Les résultats sont exprimés moyenne \pm SEM (n=10 portées par groupe; n=1 correspond à 4 cœurs fœtaux de même sexe d'une même portée). π $p < 0.01$ ANOVA 2 facteurs, effet du sexe; ρ $p < 0.05$ ANOVA 2 facteurs, effet du sexe.

La figure 14 illustre qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes RCIU et témoins quant à l'expression des protéines hexokinase 1, hexokinase 2, phosphofruktokinase 1 et pyruvate kinase M1/2. Il existe toutefois un effet du sexe pour les protéines PFK1 et PKM1/2 par ANOVA 2 facteurs. L'expression protéique

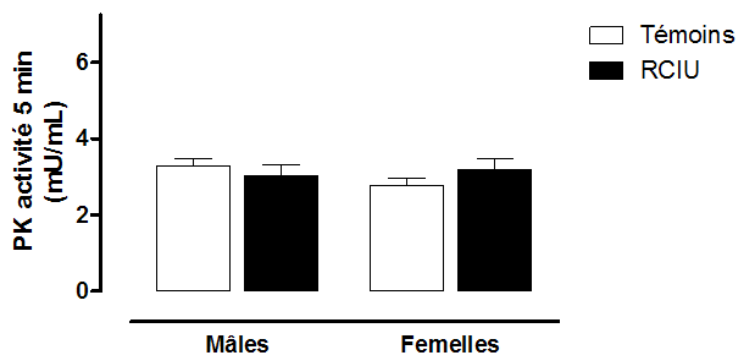
de PFK1 et PKM1/2 a une tendance à être plus élevée chez les femelles que les mâles ($p < 0,01$ et $p < 0,05$ respectivement). Cependant, le test *post-hoc* ne permet pas de déterminer un seuil significatif.

Les résultats des figures 13 et 14 suggèrent qu'il n'existerait pas d'altération quant à la capacité protéique du transport de glucose membranaire et de la voie de la glycolyse dans le cœur des fœtus RCIU. Afin d'évaluer la voie glycolytique en entier, d'autres expérimentations sur les capacités enzymatique et du transport de glucose sont nécessaires. De plus, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de quantifier les flux métaboliques des substrats et métabolites primaires, intermédiaires et finaux.

3.1.2 Activité enzymatique de la Pyruvate Kinase

La pyruvate kinase correspond à la dernière enzyme de la voie de la glycolyse cytosolique. La mesure de son activité permet de renseigner sur la cinétique maximale de l'enzyme. Cependant, une mesure du flux glycolytique est nécessaire afin de bien évaluer cette voie et de sa fonctionnalité enzymatique globale. Cette enzyme permet la formation de pyruvate qui sera transféré dans la mitochondrie afin d'entrer dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl CoA (transformé par la PDH)^{115 116 175 149}. La figure 15 ci-dessous illustre la capacité de l'enzyme pyruvate kinase à former du pyruvate par unité de temps. La figure 15A représente l'activité enzymatique de pyruvate kinase après 5 minutes tandis que la figure 15B représente l'activité enzymatique après 10 minutes. À 5 minutes, les mesures se trouvent dans la portion linéaire de la courbe hyperbolique d'activité de cette enzyme. Par contre, à 10 minutes, l'activité est dans la portion plafonnée, où la réaction est limitée par le substrat. Une unité de pyruvate kinase (mU/mL) est la quantité de transfert par l'enzyme de groupe phosphate du PEP à l'ADP.

A) Activité enzymatique de PK à 5 minutes



B) Activité enzymatique de PK à 10 minutes

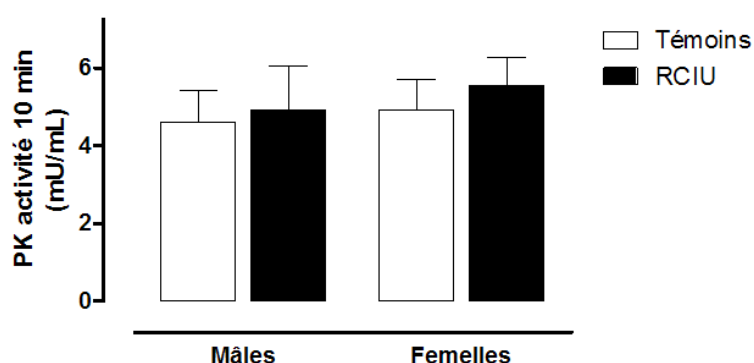


Figure 15. Activité enzymatique de la pyruvate kinase dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU. A) et B) Histogramme illustrant les résultats pour l'activité enzymatique de la pyruvate kinase à 5 et 10 minutes respectivement. Chaque groupe comprend 4 portées, avec 2 cœurs par portée. Les barres noires correspondent aux groupes RCIU tandis que les barres blanches, aux groupes témoins. Les résultats sont exprimés moyenne \pm SEM (n=4 portées par groupe; n=1 correspond à 2 cœurs fœtaux de même sexe d'une même portée).

La figure 15 démontre qu'il n'existe aucun effet du sexe ni du modèle animal RCIU sur l'activité de cette protéine. En effet, autant l'activité dans la portion linéaire de la courbe hyperbolique à 5 minutes que le plafond d'activité à 10 minutes ne diffèrent entre les groupes RCIU et témoins, mâles et femelles.

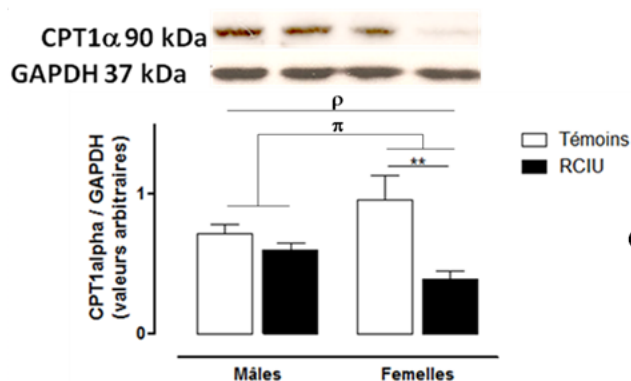
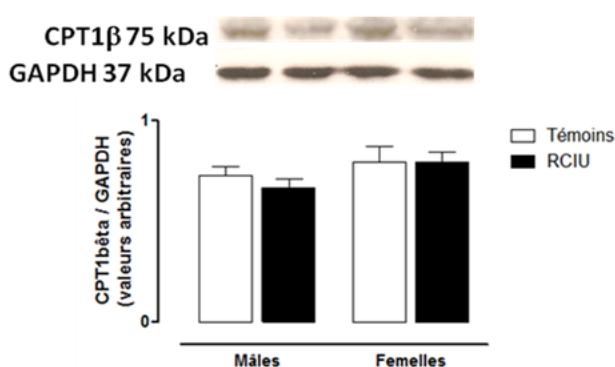
Ces résultats permettent d'affirmer que le modèle développé au laboratoire induisant une RCIU et une insuffisance placentaire suggérée n'a pas d'effet sur la

cinétique d'activité enzymatique de la voie des glucides dans les cellules cardiaques fœtales.

3.2 MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE DES ACIDES GRAS

Transport intra-mitochondrial

La figure 16 ci-dessous illustre l'expression des protéines CPTs effectuant le transport des acyls CoA à longues chaînes constituant le complexe CPT1-CACT-CPT2. Les figures 16A et 16B représentent l'expression protéique du transport du cytosol vers l'espace intermembranaire mitochondrial de ces acyls CoA à longues chaînes par les CPT1 α et β respectivement. Quant à la figure 16C, elle représente l'expression protéique du transport des acylcarnitines à longues chaînes de l'espace intermembranaire mitochondrial vers la matrice mitochondriale par CPT2. Ces transporteurs constituent la première étape importante du métabolisme des acides gras affectant l'entrée des LCFAs, constituant les principaux combustibles lipidiques cardiaques, dans la mitochondrie^{137 180 182}. Ces CPTs sont donc des marqueurs de la voie de β -oxydation des acides gras étudiée dans le cadre du profil métabolique général.

A) Transporteur mitochondrial CPT1 α B) Transporteur mitochondrial CPT1 β 

C) Transporteur mitochondrial CPT2

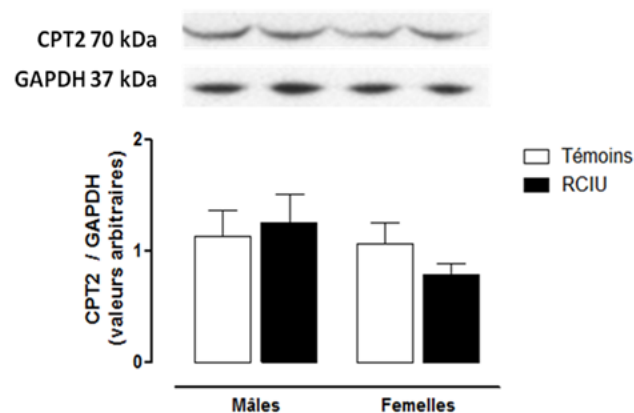


Figure 16. Expression protéique des CPTs, principaux déterminants de la β -oxydation des acides gras, dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU. A), B) et C) Histogramme illustrant l'expression protéique de CPT1 α , CPT1 β et CPT2 respectivement. Une illustration d'un gel représentatif d'immunobuvardage de type Western est présente au-dessus de chacun des histogrammes. Chaque représentant de chaque groupe est représenté au-dessus de leur colonne respective. Les barres noires correspondent aux groupes RCIU tandis que les barres blanches, aux groupes témoins. Les valeurs de densitométrie obtenues sont reportées sur l'expression relative de la protéine GAPDH. Les résultats sont exprimés moyenne \pm SEM (n=10 portées par groupe; n=1 correspond à 4 cœurs fœtaux de même sexe d'une même portée). ** p<0.01 vs témoins du même sexe. π p<0.01 ANOVA 2 facteurs, effet du sexe ρ p<0.05 ANOVA 2 facteurs, effet d'interaction.

Tel qu'illustré à la figure 16B et C, il n'y a pas de différence significative entre les groupes RCIU et témoins quant à l'expression des protéines CPT1 β et CPT2. L'expression protéique de CPT1 α à la figure 16A est diminuée ($p < 0.01$) dans les cœurs de fœtus de femelles RCIU comparativement à leurs témoins. L'interaction montre que les groupes ne répondent pas de la même manière à l'atteinte quant à l'expression de CPT1 α . Les femelles répondent par une diminution de CPT1 α tandis que les mâles présentent l'inverse.

Cette réduction d'expression protéique de CPT1 α suggère que le modèle affecterait, au niveau cardiaque fœtal, le transport en acides gras dans la mitochondrie de manière spécifique au sexe. L'impact de cette altération sur le métabolisme lipidique cardiaque devra être investigué plus en profondeur puisque cette étude n'a dressé qu'un profil métabolique général du modèle.

3.3 MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE CARDIAQUE

Chaîne mitochondriale de transport d'électrons

Le cytochrome c est une composante importante de la chaîne respiratoire mitochondriale, passant les électrons du complexe III au IV. Son activité, son expression et sa localisation sont touchés par de multiples conditions. En effet, lors d'apoptose, il subit une translocation au cytosol pour former un apoptosome. De plus, lors d'hypoxie chronique, sa densité et son expression sont augmentées²⁶⁹. La quantification de son expression protéique constitue donc un indice de la présence ou non d'une atteinte à l'intégrité de la chaîne mitochondriale.

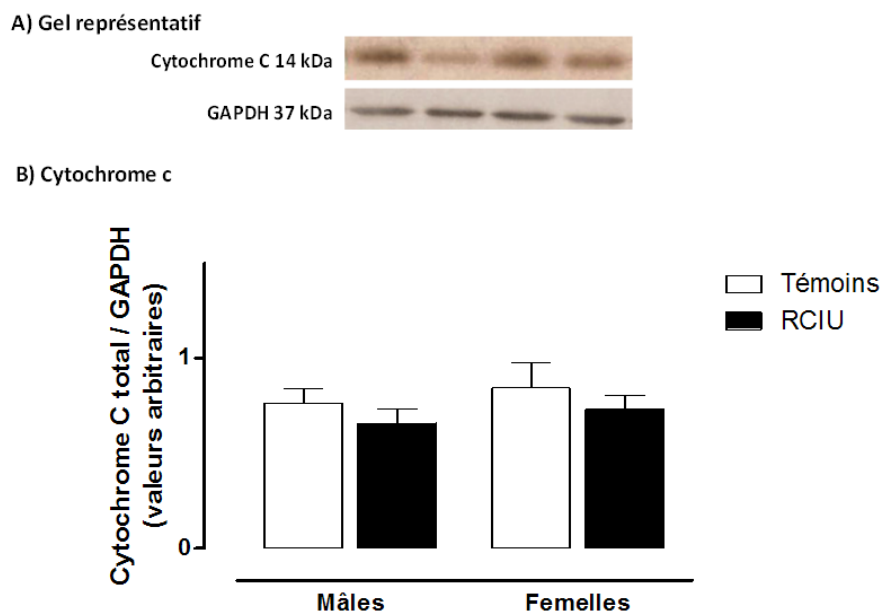


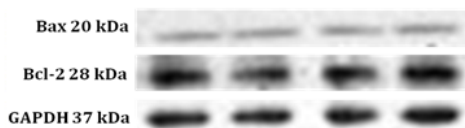
Figure 17. Expression protéique du cytochrome c dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU. A) Illustration d'un gel représentatif d'immunobuvardage de type Western. Chaque représentant de chaque groupe est représenté au-dessus de leur colonne respective. B) Histogramme illustrant l'expression protéique du cytochrome c. Les barres noires correspondent aux groupes RCIU tandis que les barres blanches, aux groupes témoins. Les valeurs de densitométrie obtenues sont reportées sur l'expression relative de la protéine GAPDH. Les résultats sont exprimés moyenne \pm SEM (n=10 portées par groupe; n=1 correspond à 4 cœurs fœtaux de même sexe d'une même portée).

Tel qu'illustré à la figure 17B, il n'y a pas de différence significative entre les groupes RCIU et témoins quant à l'expression protéique totale du cytochrome c. Ceci indique qu'il n'existe aucun effet du sexe ni du modèle animal RCIU sur l'expression de cette protéine. Ces résultats suggèrent que ces cœurs fœtaux ne présenteraient pas d'hypoxie chronique ni d'altération d'intégrité de la chaîne mitochondriale. Par contre, il n'est possible de poser aucune conclusion avec une seule composante mineure de cette chaîne respiratoire mitochondriale. Une étude approfondie de cette composante fonctionnelle essentielle de la mitochondrie devra être effectuée pour confirmer ces affirmations.

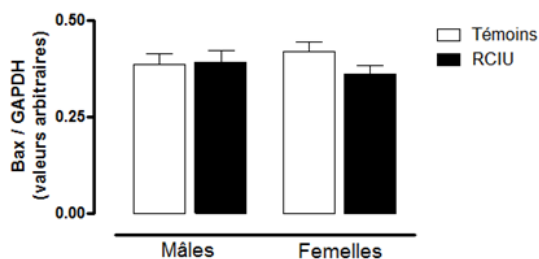
3.4 MORT CELLULAIRE : APOPTOSE

Les protéines Bax sont pro-apoptotiques et Bcl-2 anti-apoptotiques. Le ratio de ces protéines permet d'étudier sommairement l'index de balance entre les voies pro- et anti-apoptotiques relatives à la mitochondrie permettant de donner un indice sur l'état apoptotique cellulaire^{18 4 141 264 269}. La caspase 3 est clivée lors de l'apoptose, autant en voie intrinsèque qu'extrinsèque. En déterminant les proportions de clivage de cette protéine, une comparaison peut être faite entre les différents groupes afin de vérifier les niveaux apoptotiques de chacun^{7 18 269}. L'apoptose est donc mesurée par l'expression du ratio protéique Bax/Bcl-2 et du clivage de la protéine caspase 3 (clivée/non-clivée).

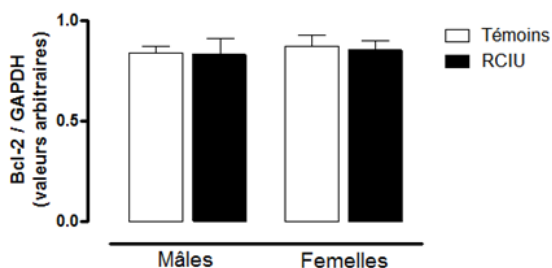
A) Gel représentatif



B) Bax



C) Bcl-2



D) Bax/Bcl-2

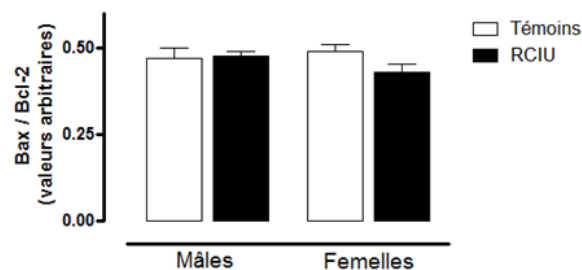
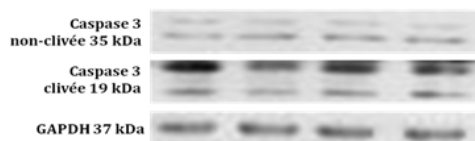


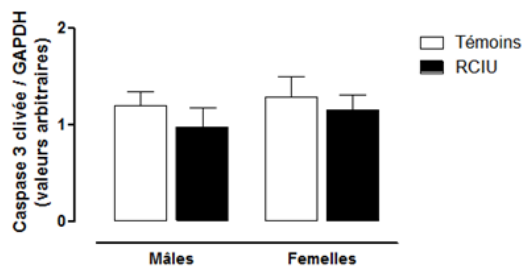
Figure 18. Expression protéique de Bax et Bcl-2 dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU. A) Illustration d'un gel représentatif d'immunobuvardage de type Western. Chaque représentant de chaque groupe est représenté au-dessus de leur colonne respective. B) et C) Histogramme illustrant l'expression protéique de Bax et Bcl-2 respectivement. D) Histogramme représentant la moyenne des ratios Bax/Bcl-2. Les barres noires correspondent aux groupes RCIU tandis que les barres blanches, aux groupes témoins. Les valeurs de densitométrie obtenues sont reportées sur l'expression relative de la protéine GAPDH. Les résultats sont exprimés moyenne \pm SEM (n=10 portées par groupe; n=1 correspond à 4 cœurs fœtaux de même sexe d'une même portée).

Tel qu'illustré à la figure 18B et C, il n'y a pas de différence significative entre les groupes RCIU et témoins quant à l'expression des protéines Bax et Bcl-2. Le ratio Bax/Bcl-2 (figure 18D) n'est pas différent non plus entre les groupes. Ceci indique qu'il n'existe aucun effet du sexe ni du modèle animal RCIU sur l'expression de ces protéines individuelles ni sur leur ratio respectif.

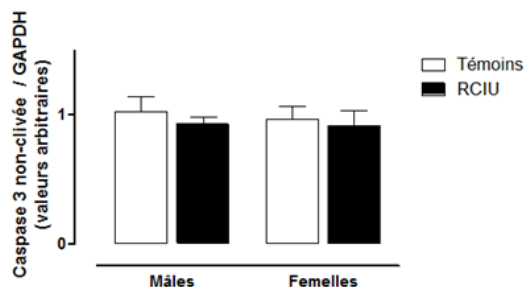
A) Gel représentatif



B) Caspase 3 clivée



C) Caspase 3 non-clivée



D) Caspase 3 clivée/non-clivée

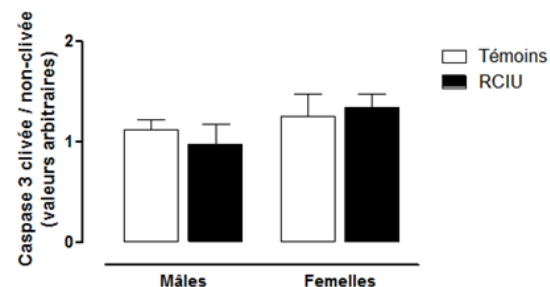


Figure 19. Expression protéique de la caspase 3 clivée et non-clivée dans les cœurs fœtaux d'animaux témoins et RCIU. A) Illustration d'un gel représentatif d'immunobuvardage de type Western. Chaque représentant de chaque groupe est représenté au-dessus de leur colonne respective. B) et C) Histogramme illustrant l'expression protéique de la caspase 3 clivée et non-clivée respectivement. D) Histogramme représentation la moyenne des ratios caspase 3 clivée/non-clivée. Les barres noires correspondent aux groupes RCIU tandis que les barres blanches, aux groupes témoins. Les valeurs de densitométrie obtenues sont reportées sur l'expression relative de la protéine GAPDH. Les résultats sont exprimés \pm moyenne SEM ($n=10$ portées par groupe; $n=1$ correspond à 4 cœurs fœtaux de même sexe d'une même portée).

Les figures 19B et C ne montrent aucune différence significative entre les groupes RCIU et témoins quant à l'expression des fractions clivées et non-clivées de la caspase 3. Le ratio de clivage de la caspase 3 (figure 19D) n'est pas différent non plus entre les groupes. Ceci suggère qu'il n'existe aucun effet du sexe ni du modèle

animal RCIU sur l'expression de ces protéines individuelles ni sur leur ratio respectif.

Les résultats présentés dans les figures 18 et 19 suggèrent que la diminution de la perfusion placentaire conduisant au modèle RCIU ne semble pas entraîner de différence apoptotique dans les cœurs fœtaux RCIU comparativement à leurs témoins respectifs. En effet, le rapport Bax/Bcl-2 inchangé représente un index de balance entre les signalisations pro-apoptotique et anti-apoptotique dans la voie intrinsèque normalement stimulée de façon physiologique en période périnatale. De son côté, le rapport de clivage de la caspase 3 inchangé est une mesure culminante des voies intrinsèque et extrinsèque apoptotiques. Cependant, ces résultats doivent être confirmés par d'autres méthodes comme celle de TUNEL par exemple.

Il est possible de résumer les résultats notés ci-dessus dans le tableau 5. Les résultats d'effets du sexe observés quant à GLUT1, PFK1 et PKM1/2 de la voie métabolique de la glycolyse démontre qu'il y a un effet lorsqu'on met tous les groupes ensemble mais il n'est pas possible de dire quels groupes sont différents suite au post-test Newman-Keuls. L'unique changement significatif est observé réside au niveau du métabolisme énergétique des acides gras, plus spécifiquement du transporteur CPT1 α marqué à la baisse chez les femelles RCIU seulement comparativement aux femelles témoins.

	Coeur foetal						n	
	Effet de la RCIU	Effet du Sexe	Interaction	Mâle Témoins vs Femelle Témoins	Mâle RCIU vs Mâle Témoins	Femelle RCIU vs Femelle Témoins		Commentaire
Apoptose								
Bax	--	--	--	--	--	--	--	10
Bcl-2	--	--	--	--	--	--	--	10
Bax/Bcl-2	--	--	--	--	--	--	--	10
Caspase 3 clivée	--	--	--	--	--	--	--	10
Caspase 3 non-clivée	--	--	--	--	--	--	--	10
Caspase 3 clivée/non-clivée	--	--	--	--	--	--	--	10
Métabolisme énergétique :								
Glycolyse								
GLUT1	--	***	--	--	--	--	--	10
GLUT4	--	--	--	--	--	--	--	10
Hexokinase 1	--	--	--	--	--	--	--	10
Hexokinase 2	--	--	--	--	--	--	--	10
PFK1	--	**	--	--	--	--	--	10
Pyruvate Kinase (PKM1/2)	--	*	--	--	--	--	--	10
Métabolisme énergétique :								
β-oxydation								
CPT1α	**	--	*	--	--	**	↓	10
CPT1β	--	--	--	--	--	--	--	10
CPT2	--	--	--	--	--	--	--	10
Métabolisme énergétique :								
Chaîne de transport d'électrons mitochondriale								
Cytochrome C total	--	--	--	--	--	--	--	10

P > 0.05 —
 P < 0.05 *
 P < 0.01 **
 P < 0.001 ***

Tableau 5. Tableau récapitulatif des résultats des analyses statistiques des immunobuvardages de type Western. Chaque groupe comprend 10 portées, avec 4 cœurs par portée. Les valeurs sont reportées sur l'expression relative de la protéine GAPDH. À gauche, les résultats de l'ANOVA 2 facteurs sont présentés en jaune-orangé. À droite, les résultats post-test Newman-Keuls sont présentés en jaune pâle. Seule l'expression protéique du transporteur CPT1α change entre les groupes de façon significative chez les femelles RCIU seulement. L'interaction présente pour CPT1α montre que les groupes ne répondent pas de la même manière à l'atteinte quant à l'expression de cette protéine. Les femelles répondent par une diminution de tandis que les mâles présentent l'inverse. L'expression des protéines de la voie de la glycolyse GLUT1, PFK1 et PKM1/2 est affectée par le sexe du fœtus sans toutefois présenter une différence significative chez un groupe en particulier.

4. Discussion

Les rates gestantes du modèle RCIU développé au laboratoire présentent une diminution de perfusion placentaire en réponse à une diète faible en sodium absorbée lors de la dernière semaine de gestation. Nous avons observé chez les fœtus un jour avant le terme que:

- 1) l'expression protéique des GLUT-1, de la phosphofructokinase-1 et celle de la pyruvate kinase M1/2 sont plus grandes dans les cœurs de femelles comparativement aux mâles;
- 2) l'expression protéique de CPT1 α est diminuée dans le cœur des fœtus RCIU et atteint un seuil significatif (post-hoc test) chez les femelles seulement;
- 3) en regard des indicateurs apoptotiques que sont les ratios Bax/Bcl-2 et caspase 3 clivée/non-clivée, aucune différence en termes d'apoptose n'est décelable entre les cœurs de fœtus RCIU ou témoins, mâles ou femelles.

L'hypothèse de départ voulant qu'«à la suite d'une diminution de perfusion placentaire pouvant affecter l'apport nutritionnel maternel, le cœur fœtal s'adapterait en diminuant son métabolisme énergétique selon le sexe du fœtus» n'est donc qu'en partie confirmée.

Les effets sur le métabolisme énergétique cardiaque fœtal d'une diminution de perfusion placentaire causant une RCIU, n'ont été qu'à peine étudiés et sont peu compris à ce jour. À la naissance, la baisse d'expression des enzymes de la glycolyse au profit de la hausse d'expression des composantes du métabolisme des acides gras suggèrent que les substrats énergétiques primaires diffèrent passant du glucose aux acides gras^{192 171 181 41 137 237}. La fin de la gestation demeure donc un moment clé de la mise en place de ces modulations du métabolisme cardiaque et explique le choix de cette période d'étude dans le cœur afin d'en dresser un profil métabolique général appréciable. Chez le rat, la dernière semaine de gestation

coïncide aussi avec l'expansion du volume sanguin maternel, la croissance hypertrophique et hyperplasique ainsi que la maturation de la majorité des organes chez le fœtus^{14 26 27 183 64}. Une perturbation lors de cette période de maturation pourrait avoir un effet important sur le métabolisme énergétique cardiaque fœtal en plein remaniement.

Le profil du métabolisme énergétique cardiaque fœtal en regard de la voie glycolytique, n'a été effectué qu'en se fiant aux enzymes de cette voie dites limitantes *in vitro*. Dans le modèle développé au laboratoire, le potentiel protéique du métabolisme énergétique cardiaque fœtal des glucides semble augmenté dans les cœurs femelles comparativement aux mâles (sans passer le *post-hoc*) sans avoir d'effet de la RCIU. D'ailleurs, il a été démontré que la concentration sérique de glucose est la même entre les fœtus et mères, témoins et RCIU (Bibeau et Brochu, informations personnelles). Cette stabilité glucidique dans le sérum fœtal est possiblement due à une néoglucogénèse rénale et hépatique compensatoire^{93 143}. Dans une étude comparant des placentas humains à terme et prématurés avec des contrôles respectifs de grossesse normale, l'expression protéique de la phosphofructokinase (PFK), de la pyruvate kinase (PK) et l'hexokinase (HK) ainsi que l'activité enzymatique de PK et HK ne sont pas différents entre les groupes témoins et RCIU. Par contre, l'activité de PFK est diminuée de 32% chez les RCIU¹⁴⁹. Le placenta représente la barrière principale restreignant l'apport nutritionnel fœtal. Une diminution du métabolisme glycolytique placentaire par la réduction de l'activité de la PFK induit une altération dans le transfert de nutriments au fœtus¹⁴⁹. Ces résultats suggèrent que même si la protéine est exprimée de la même façon dans les tissus témoins et RCIU, l'activité peut être modifiée. Dans la poursuite de nos travaux, il serait donc d'intérêt de vérifier, en plus de l'activité enzymatique de PK déjà établie, celle de HK1 et 2 ainsi que celle de PFK1. Il faudrait également déterminer quels sont les effecteurs activateurs ou inhibiteurs impliqués dans les

changements possibles d'activité enzymatique. De plus, il est possible qu'une différence d'expression ou d'activité existe au niveau des autres protéines de cette voie métabolique. Une étude approfondie de toutes les enzymes de la glycolyse est nécessaire afin de confirmer cette affirmation. Pour terminer, l'étude des flux métaboliques des substrats, métabolites intermédiaires et finaux de cette voie glycolytique serait nécessaire afin d'évaluer la fonctionnalité réelle *in vivo* chez les cœurs fœtaux de ce modèle RCIU.

Tel que décrit dans le paragraphe précédent, la concentration de glucose sérique fœtale et maternelle n'est pas différente entre les témoins et les RCIU. Malgré que ces concentrations glucidiques semblent demeurer stables, il est possible que le ratio sanguin glucides/lipides soit affecté. Ce dernier pourrait influencer l'expression protéique et l'activité des transporteurs mitochondriaux CPT1 par la disponibilité relative de chacun des substrats^{180 195}. D'ailleurs des défauts dans le transfert materno-fœtal en acides gras et en acides aminés ont déjà été caractérisés dans différents modèles RCIU. En effet, il a été démontré que le transfert de LCFA, particulièrement les polyinsaturés, était réduit dans les placentas humains RCIU du troisième trimestre comparativement aux témoins^{152 149 121 177}. Le transfert nutritionnel de glucose, acides gras et acides aminés n'a pas été mesuré à ce jour dans le modèle RCIU développé au laboratoire. Il serait intéressant de vérifier dans le futur le niveau de transfert des nutriments (acides aminés, acides gras et glucose), du sang maternel vers le fœtus, par l'utilisation de substrats radiomarqués. Ces nouvelles données permettront d'étoffer le profil métabolique débuté lors de cette étude.

Chez des rats dont la mère a reçu une diète restreinte en calories pour toute la période de gestation et de lactation, l'activité des CPTs et leur susceptibilité à

l'inhibition par le malonyl CoA étaient inchangées dans le cœur de la progéniture à l'âge adulte ¹¹³. L'étude a pu démontrer une diminution normale de l'utilisation du glucose à l'âge adulte sans atteinte du système CPT ¹¹³. Cette étude va à l'encontre de nos résultats observés à l'âge fœtal dans les cœurs de rats RCIU. Toutefois, les isoformes des CPT1 diffèrent entre l'âge adulte et fœtal. En effet, CPT1 α , isoforme moins sensible à l'inhibition par le malonyl CoA que CPT1 β , est responsable de 60% de la β -oxydation en prénatal pour ne correspondre qu'à 4% à l'âge adulte dans les cœurs de rat ^{113 29 45 182 137}. Une étude approfondie du système CPT1-CT-CPT2 par la quantification du flux intra-mitochondrial des acides gras permettrait de compléter le profil du métabolisme lipidique cardiaque fœtal débuté dans le cadre de ce projet.

Dans le modèle développé au laboratoire, la réponse à divers stimuli varie en fonction du sexe; une sorte de dimorphisme sexuel est présent. En effet, l'expression cardiaque fœtale protéique de GLUT-1, de la PFK 1 et celle de la PKM1/2 sont plus grandes chez les femelles comparativement aux mâles. De plus, l'expression cardiaque fœtale protéique de CPT1 α est diminuée chez les RCIU en atteignant un seuil significatif (*post-hoc* test) chez les femelles seulement. Les dimorphismes cardiaques sont plus évidents à l'âge adulte. Par exemple, la progression de l'hypertrophie vers la défaillance est plus rapide chez les rats mâles avec insuffisance cardiaque hypertensive spontanée comparativement aux femelles. Ceci corrèle avec une longueur plus courte des cardiomyocytes femelles ^{189 39}. De plus, la contractilité des muscles papillaires cardiaques de rats Wistar est plus grande chez les femelles que chez les mâles. Ceci corrèle avec une largeur relative plus grande chez les cardiomyocytes femelles ³⁹. Le ventricule gauche de la femme a une plus grande capacité de raccourcissement, un plus petit volume et une plus petite taille ventriculaires en fin de systole. Celui-ci génère aussi plus de pression que le ventricule gauche de l'homme. Les femmes ont donc de meilleures

chances de survie à la sténose aortique versus les hommes qui en souffrent⁴⁹. Les différences spécifiques au sexe pourraient être dues en partie aux différences hormonales sexuelles surtout à l'âge adulte²⁶⁷. D'ailleurs, il a été démontré que la gonadectomie altère la performance contractile de cœurs femelles et mâles³⁹. Chez des souris dont le gène pour PPAR α (-/-) est supprimé, un traitement à l'etomoxir, bloqueur des CPT, n'entraîne pas d'augmentation, normalement attendue, d'expression des transporteurs CPT et des enzymes de la β -oxydation. Cela suggère donc un rôle pour PPAR α dans l'activation des CPTs. Dans ce modèle de souris, l'inhibition du flux d'acides gras intra-mitochondrial a comme résultat une accumulation de lipides dans le cœur et le foie plus marquée et sévère chez les mâles comparativement aux femelles. Le sexe aurait donc aussi un effet sur le métabolisme des lipides du cœur en provoquant, de façon plus marquée chez les mâles, l'abolition de la réponse compensatoire homéostatique normale. D'ailleurs, les taux de mortalité induits par le modèle, sont chez les mâles de 100% comparativement à 25% chez les femelles. Les taux de mortalité des mâles et femelles sont par contre équivalents (25%) lorsque les mâles sont traités au 17 β -estradiol^{80 81}. Une recherche a évalué le dimorphisme sexuel existant quant aux réponses neuroendocriniennes, cardiovasculaires et métaboliques lors de périodes d'exercice chez l'humain⁶⁹. Cette étude a démontré que durant l'exercice, les hommes ont de plus grandes réponses du système nerveux autonome (épinéphrine, norépinéphrine, polypeptide pancréatique), cardiovasculaire (pressions systolique et artérielle moyenne) et du métabolisme de l'oxydation des hydrates de carbone comparativement aux femmes⁶⁹. Les femmes, quant à elles, répondraient à la diminution d'activité de leur système nerveux sympathique durant l'exercice en augmentant les réponses lipolytiques (glycérol et acides gras non-estérifiés)⁶⁹. Cette étude, tout comme le profil métabolique élaboré au laboratoire, démontre une altération du métabolisme lipidique cardiaque spécifique au genre féminin.

Les résultats d'expression du rapport Bax/Bcl-2 et de clivage de la caspase 3 obtenu par le rapport caspase 3 clivée/non-clivée se sont avérés semblables entre les groupes RCIU et témoins, mâles et femelles. Ceci nous indique que les cœurs fœtaux du modèle développé au laboratoire ne semblent pas démontrer de différence apoptotique comparativement à leurs témoins respectifs. Ces cœurs ne seraient donc pas en état de défaillance mais plutôt en adaptation suite à l'atteinte maternelle induite par la diète faible en sodium. Afin de palier au déficit énergétique et préserver la survie cellulaire, les cœurs adultes en état d'hypoxie/ischémie, après plusieurs minutes, remanient leur métabolisme énergétique en retournant à un profil prénatal où la glycolyse devient la voie métabolique énergétique primaire. Sans ces changements adaptatifs rapides, une dysfonction contractile apparaîtrait et ultimement, cette défaillance conduirait à la mort des cellules cardiaques^{73 194}. Le profil métabolique dressé dans le cadre de ces travaux a démontré qu'il y a altération possible du métabolisme énergétique cardiaque des cœurs fœtaux des femelles RCIU. Cette réponse adaptative à un état nutritionnel possiblement diminué pourrait être à l'origine de l'absence de différence apoptotique entre les groupes. Par contre, une confirmation de l'absence de différence apoptotique entre les groupes par la méthode de TUNEL ou par l'activité du pore PTP mitochondrial s'impose. L'apoptose physiologique constitue une étape obligatoire dans le cadre de la maturation cardiaque. Il est possible que lors de cette étude, la fenêtre de temps observée ne soit pas adéquate pour apprécier la mise en place de cette apoptose physiologique. Dans ce cas, il serait intéressant de reprendre les manipulations sur des cœurs nataux et postnataux.

La diminution de l'expansion du volume sanguin maternel est induite par la diète faible en sodium chez des rates gestantes. Cette réduction sanguine est en corollaire avec la perfusion placentaire et les nutriments transférés de la mère au fœtus²⁰¹. Cette condition semble affecter le métabolisme énergétique cardiaque fœtal tel que démontré dans le cadre de ce profil métabolique. La réponse adaptative du cœur fœtal ne semble pas être due au manque de transfert d'oxygène au fœtus. Comme stipulé plus tôt, le manque d'oxygène amène l'augmentation de l'expression des gènes régulés par HIF-1 (tel GLUT1)^{181 210 148}. De plus, l'hypoxie chronique augmente le ratio Bax/Bcl-2, en diminuant l'expression de Bcl-2, et active le clivage de la caspase 3^{18 269}. Cependant, dans les cœurs fœtaux, le modèle RCIU n'affecte pas l'expression protéique ni de GLUT1 ni des ratios Bax/Bcl-2 et de clivage de la caspase 3. De plus, le cœur fœtal possède de meilleures tolérance et adaptation au manque en oxygène que le cœur adulte. Il est donc moins susceptible de démontrer la présence de marqueurs hypoxiques. Pour renchérir, lors d'une atteinte asymétrique hypoxique, il y a augmentation de la synthèse des cytochromes mitochondriaux dont le cytochrome c²⁶⁹. Par contre, les cœurs fœtaux du modèle RCIU développé au laboratoire ne démontraient pas de différence significative quant à la quantité totale de cytochrome c comparativement aux groupes témoins. Ces données réunies démontrent que les cœurs fœtaux RCIU étudiés ne sont pas assujettis à une atteinte hypoxique. La mesure du flux en oxygène materno-fœtal et la quantification d'autres marqueurs hypoxiques, tel la dimérisation et la translocation au noyau d'HIF-1 α , sont nécessaires afin de confirmer ou infirmer l'absence d'hypoxie dans les cœurs du modèle RCIU. De plus, étant donné que la quantité protéique de cytochromes c demeure semblable entre les différents groupes, la chaîne respiratoire mitochondriale ne semble pas affectée dans son intégrité. Cependant, cette protéine n'a qu'une contribution minimale à la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci implique que les autres composantes des différents complexes protéiques

doivent être étudiées avant de pouvoir porter des conclusions sur l'intégrité de cette chaîne fonctionnelle.

Le modèle développé au laboratoire représente une RCIU asymétrique démontrée par une redistribution du flot sanguin fœtal au profit du cœur et du cerveau^{71 20 151}⁸. Les résultats obtenus lors de cette étude semblent démontrer un faible effet de la baisse de perfusion placentaire sur le métabolisme énergétique cardiaque fœtal, ce qui est en soit très positif pour le devenir de cet être. Les fœtus RCIU du modèle de diète faible en sodium s'adaptent en redistribuant leur flot sanguin, en modifiant leur métabolisme énergétique cardiaque et en augmentant leur néoglucogénèse rénale (travaux d'Étienne Khoury non publiés) leur permettant ainsi d'éviter des atteintes majeures.

Nos recherches portent sur un type particulier de RCIU asymétrique de nature idiopathique présent lors de 30% des cas de cette complication gestationnelle. Les résultats ne peuvent pas être reportés à l'ensemble des RCIU. Ils apportent toutefois une piste quant à ce type particulier de RCIU chez l'humain puisque le modèle de rat développé au laboratoire est adéquat. L'étude a ciblé des protéines enzymatiques et transporteurs particuliers afin de caractériser des voies métaboliques globales et d'en obtenir un profil métabolique cardiaque fœtal. Une étude exhaustive complète de toutes les protéines présentes dans ces voies métaboliques, afin d'avoir une vision plus large, est toutefois essentielle. En effet, les protéines ciblées sont dites limitantes seulement dans le cadre d'études *in vitro*. Par contre, lorsque ces expériences sont transposées dans un modèle *in vivo*, aucune enzyme ne ressort comme étant limitante de la voie métabolique; elles fonctionnent en symbiose, en équilibre. Une étude complète des voies métaboliques est donc nécessaire afin de confirmer les résultats obtenus lors de ce

profil métabolique. En effet, il est possible que certains changements ne soient pas décelés par l'approche expérimentale utilisée dans le cadre de cette étude.

Une limite du projet tient à la récolte de données sur les voies métaboliques obtenue seulement par immunobuvardages de type Western sans support d'activité enzymatique (outre la pyruvate kinase) ni de flux métabolique. Même si l'expression protéique des enzymes et transporteurs étudiés demeure inchangée, il se peut que leur activité enzymatique soit altérée. En effet, des phosphorylations, des altérations de la conformation tridimensionnelle, un changement dans la disponibilité des substrats, des rétrocontrôles inhibiteurs/activateurs, des ubiquitinations et autres cofacteurs peuvent, entre autres, affecter le pouvoir enzymatique des protéines étudiées. Il est donc d'intérêt d'étudier la fonctionnalité protéique par la mesure des activités enzymatiques et du transport des différentes composantes des voies métaboliques.

Cette étude a permis d'investiguer les réponses du métabolisme énergétique cardiaque fœtal face à une atteinte maternelle entraînant une diminution de la perfusion placentaire et donc de l'apport en nutriments au fœtus. Cependant, beaucoup de paramètres doivent encore être évalués afin d'être en mesure d'intervenir auprès des individus souffrant d'une RCIU et ainsi de prévenir le développement futur de conditions pathologiques à l'âge adulte induites par cette atteinte prénatale. Il est d'intérêt de quantifier la molécule carrefour des voies métaboliques énergétiques cardiaques qu'est l'acétyl CoA. Cette mesure permettra d'avoir une confirmation directe de la diminution du métabolisme énergétique cardiaque global. Bien que la quantité protéique des CPT1 α soit diminuée, le flux des acyls CoA à longues chaînes vers l'intérieur de la mitochondrie doit être vérifié. En effet, en plus de leur expression protéique, la capacité de ces transporteurs

pourrait être altérée, par exemple, par leur inhibition par le malonyl CoA. Cette dernière protéine devrait d'ailleurs être quantifiée afin d'évaluer son pouvoir d'inhibition. Le flux de pyruvate du cytosol vers l'intérieur de la mitochondrie par le symporteur pyruvate-H⁺ doit être évalué. En effet, sans son entrée dans la mitochondrie sous forme de pyruvate, le glucose ne peut pas dégager l'essentiel de son énergie constitutionnelle. Le rapport entre la production et la consommation d'énergie doit être évalué pour bien caractériser le métabolisme énergétique général cardiaque fœtal lors d'une RCIU. Ce rapport est donné par la quantité d'ATP produite sur la quantité d'ADP totale^{276 219}. Ce ratio diminuant en temps d'ischémie, de dysfonction et de défaillance cardiaques, est représentatif de la détresse cardiaque induite. Il demeure par contre inchangé lorsque le cœur est dans un état de dysfonction du myocarde réversible (hibernation cardiaque, adaptation)²¹¹. Ces données réunies permettraient de confirmer irrémédiablement les résultats obtenus lors de cette étude.

Une altération épigénétique du patron de méthylation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) des cellules cardiaques est possiblement présente¹⁶⁶. Cette méthylation des cytosines de l'ADN en 5-méthylcytosines peut être appliquée à un gène en entier ou simplement à un locus. Elle induit une diminution de la transcription du gène en ARNm. Si la méthylation se trouve dans la région promoteur, c'est le gène en aval qui est réprimé. La plupart des méthylations de l'ADN sont réversibles (traitables) même si elles se transmettent lors de la mitose^{38 77 107}. Ces altérations épigénétiques pourraient être en cause dans la dormance des atteintes induites (théorie de programmation fœtale). Elles réactiveraient ces dernières lors d'un stress ultérieur à l'âge adulte. Il a d'ailleurs été proposé que la méthylation de l'ADN soit responsable du développement de phénotypes particuliers causant des conditions pathologiques et atteintes comportementales^{225 163}. Comme stipulé plus tôt, cette programmation fœtale pourrait aussi être due

à un dommage mitochondrial en dormance détectable seulement lorsque l'on inflige un stress ultérieur ¹⁵⁵. Donc, il est d'intérêt de vérifier les atteintes mitochondriales possibles. De plus, il serait d'intérêt de poursuivre l'étude de façon longitudinale, c'est-à-dire en vérifiant ces mêmes protéines des voies métaboliques à 5 semaines (puberté chez le rat), 12 semaines (jeune adulte chez le rat) et à 40 semaines (adulte avancé chez le rat). Il serait, en effet, intéressant de vérifier à ces différentes périodes de la vie de l'animal, en infligeant un stress, par exemple par ischémie-reperfusion, si les atteintes foétales s'expriment de nouveau. Ceci permettrait de confirmer la théorie de programmation foétale, les atteintes mitochondriales dormantes et les patrons de méthylations inhibiteurs. L'expression et l'activité fonctionnelle des protéines ciblées dans l'étude devraient être évaluées en période postnatale immédiate et lors des deux premières semaines de vie. Ceci permettrait d'évaluer si les altérations du métabolisme énergétique cardiaque observées à l'âge foetal sont toujours présentes, si elles sont rattrapées (*catch-up*; compensées, corrigées) ou si elles entrent en dormance.

En conclusion, cette étude constitue la première, à notre connaissance, s'intéressant aux réponses métaboliques énergétiques cardiaques chez le fœtus en fin de gestation suite à une atteinte maternelle causant une RCIU asymétrique de type idiopathique. Notre étude, dressant un profil métabolique, a permis de conclure que l'insuffisance placentaire induite par la diète faible en sodium semble causer une altération adaptative du métabolisme énergétique cardiaque foetal caractérisée par un dimorphisme sexuel. Ainsi, malgré une baisse de l'expansion volumique et de perfusion placentaire, le fœtus luttant pour sa survie paraît s'adapter rapidement à une baisse possible de nutriments maternels. Ces changements sont subtils mais n'en demeurent pas moins présents et considérables. Ils deviennent d'ailleurs importants à long terme induisant une prédisposition au développement de pathologies à l'âge adulte tel l'hypertension

artérielle, le syndrome X, le diabète de type 2, la dyslipidémie, les maladies coronariennes.

Nos travaux sont donc prometteurs ouvrant ainsi la porte à une meilleure compréhension de la réponse adaptative énergétique cardiaque de ces individus RCIU. Cette étude permet de faire le pont entre la RCIU et les atteintes cardiovasculaires prédisposées. Les maladies cardiovasculaires sont responsables au Québec de plus de 26% des décès, constituant la deuxième cause de mortalité après les tumeurs malignes ². La qualité de vie des individus prédisposés à ces conditions pathologiques pourrait se voir améliorée et les dépenses gouvernementales liées aux soins de santé seraient amoindries.

5. Bibliographie

- ¹"Sudden infant death and inherited disorders of fat oxidation," *Lancet* 2(8515), 1073 (1986).
- ²"Tableau 1-6 : Décès Et Taux De Mortalité, Selon Certains Groupes De Causes, Le Sexe Et La Géographie," in 2010).
- ³E. Abdelwahid, L. J. Pelliniemi, and E. Jokinen, "Cell death and differentiation in the development of the endocardial cushion of the embryonic heart," *Microsc. Res. Tech.* 58(5), 395 (2002).
- ⁴E. Abdelwahid, *et al.*, "Apoptosis in the pattern formation of the ventricular wall during mouse heart organogenesis," *Anat. Rec.* 256(2), 208 (1999).
- ⁵E. Abdelwahid, *et al.*, "Cellular disorganization and extensive apoptosis in the developing heart of mice that lack cardiac muscle alpha-actin: apparent cause of perinatal death," *Pediatr. Res.* 55(2), 197 (2004).
- ⁶N. A. Abumrad, *et al.*, "Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36," *J. Biol. Chem.* 268(24), 17665 (1993).
- ⁷D. Acehan, *et al.*, "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation," *Mol. Cell* 9(2), 423 (2002).
- ⁸B. T. Alexander, "Fetal programming of hypertension," *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 290(1), R1-R10 (2006).
- ⁹G. R. Alexander, *et al.*, "US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, hispanics, and blacks," *Pediatrics* 111(1), e61-e66 (2003).
- ¹⁰S. C. Allen and H. Muirhead, "Refined three-dimensional structure of cat-muscle (M1) pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å," *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 52(Pt 3), 499 (1996).
- ¹¹R. H. Anderson, "The disposition and innervation of atrioventricular ring specialized tissue in rats and rabbits," *J. Anat.* 113(Pt 2), 197 (1972).
- ¹²A. Andres, J. Satrustegui, and A. Machado, "Development of enzymes of energy metabolism in rat heart," *Biol. Neonate* 45(2), 78 (1984).
- ¹³R. J. Ascuitto and N. T. Ross-Ascuitto, "Substrate metabolism in the developing heart," *Semin. Perinatol.* 20(6), 542 (1996).
- ¹⁴J. C. Atherton, *et al.*, "Changes in water and electrolyte balance, plasma volume and composition during pregnancy in the rat," *J. Physiol* 330, 81 (1982).
- ¹⁵E. Aubert-Foucher, B. Font, and D. C. Gautheron, "Rabbit heart mitochondrial hexokinase: solubilization and general properties," *Arch. Biochem. Biophys.* 232(1), 391 (1984).
- ¹⁶S. W. Aucott, P. K. Donohue, and F. J. Northington, "Increased morbidity in severe early intrauterine growth restriction," *J. Perinatol.* 24(7), 435 (2004).
- ¹⁷H. Azoulay-Zohar, *et al.*, "In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death," *Biochem. J.* 377(Pt 2), 347 (2004).
- ¹⁸S. Bae, *et al.*, "Effect of maternal chronic hypoxic exposure during gestation on apoptosis in fetal rat heart," *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285(3), H983-H990 (2003).

- ¹⁹S. Bae and L. Zhang, "Prenatal cocaine exposure increases apoptosis of neonatal rat heart and heart susceptibility to ischemia-reperfusion injury in 1-month-old rat," *Br. J. Pharmacol.* 144(7), 900 (2005).
- ²⁰H. Balcazar and J. Haas, "Classification schemes of small-for-gestational age and type of intrauterine growth retardation and its implications to early neonatal mortality," *Early Hum. Dev.* 24(3), 219 (1990).
- ²¹S. K. Banerjee, *et al.*, "SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states," *Cardiovasc. Res.* 84(1), 111 (2009).
- ²²Y. Barak, *et al.*, "PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development," *Mol. Cell* 4(4), 585 (1999).
- ²³P. M. Barger and D. P. Kelly, "PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism," *Trends Cardiovasc. Med.* 10(6), 238 (2000).
- ²⁴D. J. Barker, "In utero programming of cardiovascular disease," *Theriogenology* 53(2), 555 (2000).
- ²⁵D. J. Barker, *et al.*, "Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life," *Lancet* 341(8850), 938 (1993).
- ²⁶W. M. Barron, "Volume homeostasis during pregnancy in the rat," *Am. J. Kidney Dis.* 9(4), 296 (1987).
- ²⁷W. M. Barron, B. A. Stamoutsos, and M. D. Lindheimer, "Role of volume in the regulation of vasopressin secretion during pregnancy in the rat," *J. Clin. Invest* 73(4), 923 (1984).
- ²⁸E. Barta and A. Drugan, "Glucose transport from mother to fetus--a theoretical study," *J. Theor. Biol.* 263(3), 295 (2010).
- ²⁹B. Bartelds, *et al.*, "Myocardial carnitine palmitoyltransferase I expression and long-chain fatty acid oxidation in fetal and newborn lambs," *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 286(6), H2243-H2248 (2004).
- ³⁰F. C. Battaglia and G. Meschia, "Principal substrates of fetal metabolism," *Physiol Rev.* 58(2), 499 (1978).
- ³¹M. C. Battista, *et al.*, "Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats," *J. Physiol* 565(Pt 1), 197 (2005).
- ³²M. C. Battista, *et al.*, "Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood," *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 283(1), E124-E131 (2002).
- ³³S. Bedard, *et al.*, "Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction," *J. Physiol* 562(Pt 3), 937 (2005).
- ³⁴G. I. Bell, *et al.*, "Molecular biology of mammalian glucose transporters," *Diabetes Care* 13(3), 198 (1990).
- ³⁵A. L. Bernal, *et al.*, "11 beta-Hydroxyteroid dehydrogenase activity (E.C. 1.1.1.146) in human placenta and decidua," *J. Steroid Biochem.* 13(9), 1081 (1980).
- ³⁶Bibeau K., PhD, Université de Montréal, 2008.
- ³⁷B. Binas, *et al.*, "Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization," *FASEB J.* 13(8), 805 (1999).
- ³⁸V. A. Blomen and J. Boonstra, "Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle," *Cell Mol. Life Sci.* (2010).
- ³⁹I. Boutin-Ganache, S. Picard, and C. F. Deschepper, "Distinct gene-sex interactions regulate adult rat cardiomyocyte width and length independently," *Physiol Genomics* 12(1), 61 (2002).

- ⁴⁰M. M. Bowker-Kinley, *et al.*, "Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex," *Biochem. J.* 329 (Pt 1), 191 (1998).
- ⁴¹J. M. Brandt, F. Djouadi, and D. P. Kelly, "Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha," *J. Biol. Chem.* 273(37), 23786 (1998).
- ⁴²J. Bristow, D. M. Bier, and L. G. Lange, "Regulation of adult and fetal myocardial phosphofructokinase. Relief of cooperativity and competition between fructose 2,6-bisphosphate, ATP, and citrate," *J. Biol. Chem.* 262(5), 2171 (1987).
- ⁴³H. J. Bromme and J. Holtz, "Apoptosis in the heart: when and why?," *Mol. Cell Biochem.* 163-164, 261 (1996).
- ⁴⁴N. F. Brown, *et al.*, "Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes," *Biochem. J.* 327 (Pt 1), 225 (1997).
- ⁴⁵N. F. Brown, *et al.*, "Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart," *J. Biol. Chem.* 270(15), 8952 (1995).
- ⁴⁶M. Brownlee, "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications," *Nature* 414(6865), 813 (2001).
- ⁴⁷Y. Burelle, *et al.*, "Alterations in mitochondrial function as a harbinger of cardiomyopathy: lessons from the dystrophic heart," *J. Mol. Cell Cardiol.* 48(2), 310 (2010).
- ⁴⁸C. Cadorette, *et al.*, "Effects of potassium channel modulators on myotropic responses of aortic rings of pregnant rats," *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 278(2), H567-H576 (2000).
- ⁴⁹J. D. Carroll, *et al.*, "Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly," *Circulation* 86(4), 1099 (1992).
- ⁵⁰A. Castello, *et al.*, "Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone," *J. Biol. Chem.* 269(8), 5905 (1994).
- ⁵¹I. Cetin and G. Alvino, "Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review," *Placenta* 30 Suppl A, S77-S82 (2009).
- ⁵²K. K. Cheema, *et al.*, "Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction," *Br. J. Nutr.* 93(4), 471 (2005).
- ⁵³C. Chen, *et al.*, "Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia," *J. Biol. Chem.* 276(12), 9519 (2001).
- ⁵⁴R. A. Chizzonite and R. Zak, "Regulation of myosin isoenzyme composition in fetal and neonatal rat ventricle by endogenous thyroid hormones," *J. Biol. Chem.* 259(20), 12628 (1984).
- ⁵⁵B. Christian, *et al.*, "Palmitate oxidation by the mitochondria from volume-overloaded rat hearts," *Mol. Cell Biochem.* 180(1-2), 117 (1998).
- ⁵⁶V. M. Christoffels, *et al.*, "Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart," *Dev. Biol.* 223(2), 266 (2000).
- ⁵⁷S. Chung, *et al.*, "Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation," *J. Mol. Cell Cardiol.* 48(4), 725 (2010).

- ⁵⁸S. Cianfarani, *et al.*, "Growth, IGF system, and cortisol in children with intrauterine growth retardation: is catch-up growth affected by reprogramming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis?," *Pediatr. Res.* 51(1), 94 (2002).
- ⁵⁹C. M. Clark, Jr., B. Beatty, and D. O. Allen, "Evidence for delayed development of the glucagon receptor of adenylate cyclase in the fetal and neonatal rat heart," *J. Clin. Invest* 52(5), 1018 (1973).
- ⁶⁰R. A. Coleman, "Placental metabolism and transport of lipid," *Fed. Proc.* 45(10), 2519 (1986).
- ⁶¹J. G. Coles, *et al.*, "Cardioprotective stress response in the human fetal heart," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129(5), 1128 (2005).
- ⁶²C. Communal, *et al.*, "Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway," *Circulation* 98(13), 1329 (1998).
- ⁶³G. A. Cook, *et al.*, "Differential regulation of carnitine palmitoyltransferase-I gene isoforms (CPT-I alpha and CPT-I beta) in the rat heart," *J. Mol. Cell Cardiol.* 33(2), 317 (2001).
- ⁶⁴H. B. Corstius, *et al.*, "Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts," *Pediatr. Res.* 57(6), 796 (2005).
- ⁶⁵J. R. Couch, T. C. West, and H. E. Hoff, "Development of the action potential of the prenatal rat heart," *Circ. Res.* 24(1), 19 (1969).
- ⁶⁶R. M. Cowett and H. M. Farrag, "Selected principles of perinatal-neonatal glucose metabolism," *Semin. Neonatol.* 9(1), 37 (2004).
- ⁶⁷R. M. Cowett, R. E. Rapoza, and N. L. Gelardi, "The contribution of glucose to neonatal glucose homeostasis in the lamb," *Metabolism* 47(10), 1239 (1998).
- ⁶⁸W. S. da-Silva, *et al.*, "Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense: steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria," *J. Biol. Chem.* 279(38), 39846 (2004).
- ⁶⁹S. N. Davis, *et al.*, "Effects of gender on neuroendocrine and metabolic counterregulatory responses to exercise in normal man," *J. Clin. Endocrinol. Metab* 85(1), 224 (2000).
- ⁷⁰F. A. De Prins and F. A. Van Assche, "Intrauterine growth retardation and development of endocrine pancreas in the experimental rat," *Biol. Neonate* 41(1-2), 16 (1982).
- ⁷¹A. Delpisheh, *et al.*, "Prenatal smoking exposure and asymmetric fetal growth restriction," *Ann. Hum. Biol.* 35(6), 573 (2008).
- ⁷²C. Depre, M. H. Rider, and L. Hue, "Mechanisms of control of heart glycolysis," *Eur. J. Biochem.* 258(2), 277 (1998).
- ⁷³C. Depre and H. Taegtmeyer, "Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart," *Cardiovasc. Res.* 45(3), 538 (2000).
- ⁷⁴S. Desagher and J. C. Martinou, "Mitochondria as the central control point of apoptosis," *Trends Cell Biol.* 10(9), 369 (2000).
- ⁷⁵M. Desai, *et al.*, "Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers," *Br. J. Nutr.* 76(4), 591 (1996).
- ⁷⁶R. W. Dettman, *et al.*, "Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart," *Dev. Biol.* 193(2), 169 (1998).
- ⁷⁷O. V. Diachenko, T. V. Shevchuk, and I. Bur'ianov, "[Peculiarities of 5-methylcytosine distribution in eukaryotic genome]," *Mol. Biol. (Mosk)* 44(2), 195 (2010).

- ⁷⁸J. Diez, M. A. Fortuno, and S. Ravassa, "Apoptosis in hypertensive heart disease," *Curr. Opin. Cardiol.* 13(5), 317 (1998).
- ⁷⁹D. L. Disch, *et al.*, "Transcriptional control of a nuclear gene encoding a mitochondrial fatty acid oxidation enzyme in transgenic mice: role for nuclear receptors in cardiac and brown adipose expression," *Mol. Cell Biol.* 16(8), 4043 (1996).
- ⁸⁰F. Djouadi, *et al.*, "The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the control of cardiac lipid metabolism," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 60(5-6), 339 (1999).
- ⁸¹F. Djouadi, *et al.*, "A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha- deficient mice," *J. Clin. Invest* 102(6), 1083 (1998).
- ⁸²M. Dodic, *et al.*, "Programming effects of short prenatal exposure to cortisol," *FASEB J.* 16(9), 1017 (2002).
- ⁸³P. Dowell, *et al.*, "p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha," *J. Biol. Chem.* 272(52), 33435 (1997).
- ⁸⁴A. J. Drake, J. R. Haines, and M. I. Noble, "Preferential uptake of lactate by the normal myocardium in dogs," *Cardiovasc. Res.* 14(2), 65 (1980).
- ⁸⁵W. C. Earnshaw, *et al.*, "Biochemical mechanism of apoptotic execution," *Ann. Endocrinol. (Paris)* 61(2), 137 (2000).
- ⁸⁶R. P. Eaton, "Synthesis of plasma triglycerides in endogenous hypertriglyceridemia," *J. Lipid Res.* 12(4), 491 (1971).
- ⁸⁷Z. el Alaoui-Talibi, *et al.*, "Control of oxidative metabolism in volume-overloaded rat hearts: effect of propionyl-L-carnitine," *Am. J. Physiol* 272(4 Pt 2), H1615-H1624 (1997).
- ⁸⁸J. A. Epstein, "Developmental cardiology comes of age," *Circ. Res.* 87(10), 833 (2000).
- ⁸⁹O. Fafoula, H. Alkhayat, and K. Hussain, "Prolonged hyperinsulinaemic hypoglycaemia in newborns with intrauterine growth retardation," *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed* 91(6), F467 (2006).
- ⁹⁰B. Fagerberg, L. Bondjers, and P. Nilsson, "Low birth weight in combination with catch-up growth predicts the occurrence of the metabolic syndrome in men at late middle age: the Atherosclerosis and Insulin Resistance study," *J. Intern. Med.* 256(3), 254 (2004).
- ⁹¹Y. Fischer, *et al.*, "Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations," *J. Biol. Chem.* 272(11), 7085 (1997).
- ⁹²T. Forsen, *et al.*, "The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes," *Ann. Intern. Med.* 133(3), 176 (2000).
- ⁹³K. L. Franko, A. J. Forhead, and A. L. Fowden, "Effects of maternal dietary manipulation during different periods of pregnancy on hepatic glucogenic capacity in fetal and pregnant rats near term," *Nutr. Metab Cardiovasc. Dis.* 19(8), 555 (2009).
- ⁹⁴L. Gao, *et al.*, "Induction of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression by chronic hypoxia in PC12 cells," *FEBS Lett.* 569(1-3), 256 (2004).
- ⁹⁵M. Gauster, *et al.*, "Dysregulation of placental endothelial lipase and lipoprotein lipase in intrauterine growth-restricted pregnancies," *J. Clin. Endocrinol. Metab* 92(6), 2256 (2007).
- ⁹⁶Y. J. Geng, *et al.*, "Apoptosis of cardiac myocytes in Gsalpha transgenic mice," *Circ. Res.* 84(1), 34 (1999).
- ⁹⁷P. Georgiades, *et al.*, "Roles for genomic imprinting and the zygotic genome in placental development," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98(8), 4522 (2001).

- ⁹⁸K. D. Gerbitz, K. Gempel, and D. Brdiczka, "Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit," *Diabetes* 45(2), 113 (1996).
- ⁹⁹A. M. Gerdes, J. Kriseman, and S. P. Bishop, "Changes in myocardial cell size and number during the development and reversal of hyperthyroidism in neonatal rats," *Lab Invest* 48(5), 598 (1983).
- ¹⁰⁰G. D. Giraud, *et al.*, "Cortisol stimulates cell cycle activity in the cardiomyocyte of the sheep fetus," *Endocrinology* 147(8), 3643 (2006).
- ¹⁰¹M. O. Gray, *et al.*, "Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts," *Cardiovasc. Res.* 40(2), 352 (1998).
- ¹⁰²T. Gulick, *et al.*, "The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91(23), 11012 (1994).
- ¹⁰³J. J. Haigh, "Role of VEGF in organogenesis," *Organogenesis*. 4(4), 247 (2008).
- ¹⁰⁴M. Hallman, "Changes in mitochondrial respiratory chain proteins during perinatal development. Evidence of the importance of environmental oxygen tension," *Biochim. Biophys. Acta* 253(2), 360 (1971).
- ¹⁰⁵A. Haunstetter and S. Izumo, "Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease," *Circ. Res.* 82(11), 1111 (1998).
- ¹⁰⁶A. Hausladen and I. Fridovich, "Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not," *J. Biol. Chem.* 269(47), 29405 (1994).
- ¹⁰⁷J. Havlis and M. Trbusek, "5-Methylcytosine as a marker for the monitoring of DNA methylation," *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 781(1-2), 373 (2002).
- ¹⁰⁸A. Heltemes, *et al.*, "Chronic placental ischemia alters amniotic fluid milieu and results in impaired glucose tolerance, insulin resistance and hyperleptinemia in young rats," *Exp. Biol. Med.* (Maywood.) 235(7), 892 (2010).
- ¹⁰⁹D. J. Henderson and R. H. Anderson, "The development and structure of the ventricles in the human heart," *Pediatr. Cardiol.* 30(5), 588 (2009).
- ¹¹⁰A. Hirota, *et al.*, "Early events in development of electrical activity and contraction in embryonic rat heart assessed by optical recording," *J. Physiol* 369, 209 (1985).
- ¹¹¹A. Hirschy, *et al.*, "Establishment of cardiac cytoarchitecture in the developing mouse heart," *Dev. Biol.* 289(2), 430 (2006).
- ¹¹²A. C. Hokken-Koelega, *et al.*, "Children born small for gestational age: do they catch up?," *Pediatr. Res.* 38(2), 267 (1995).
- ¹¹³M. J. Holness, D. A. Priestman, and M. C. Sugden, "Impact of protein restriction on the regulation of cardiac carnitine palmitoyltransferase by malonyl-CoA," *J. Mol. Cell Cardiol.* 30(7), 1381 (1998).
- ¹¹⁴J. M. Huss, *et al.*, "Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle," *Mol. Cell Biol.* 24(20), 9079 (2004).
- ¹¹⁵Y. Ikeda, T. Tanaka, and T. Noguchi, "Conversion of non-allosteric pyruvate kinase isozyme into an allosteric enzyme by a single amino acid substitution," *J. Biol. Chem.* 272(33), 20495 (1997).
- ¹¹⁶K. Imamura and T. Tanaka, "Pyruvate kinase isozymes from rat," *Methods Enzymol.* 90 Pt E, 150 (1982).

- ¹¹⁷J. Itskovitz, E. F. LaGamma, and A. M. Rudolph, "Heart rate and blood pressure responses to umbilical cord compression in fetal lambs with special reference to the mechanism of variable deceleration," *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147(4), 451 (1983).
- ¹¹⁸J. E. Jalil, *et al.*, "Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle," *Circ. Res.* 64(6), 1041 (1989).
- ¹¹⁹D. E. James, M. Strube, and M. Mueckler, "Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter," *Nature* 338(6210), 83 (1989).
- ¹²⁰T. N. James, "Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart," *Annu. Rev. Physiol* 60, 309 (1998).
- ¹²¹T. Jansson, V. Scholtbach, and T. L. Powell, "Placental transport of leucine and lysine is reduced in intrauterine growth restriction," *Pediatr. Res.* 44(4), 532 (1998).
- ¹²²T. Jansson, M. Wennergren, and N. P. Illsley, "Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation," *J. Clin. Endocrinol. Metab* 77(6), 1554 (1993).
- ¹²³A. Jensen, Y. Garnier, and R. Berger, "Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia," *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 84(2), 155 (1999).
- ¹²⁴C. T. Jones and T. P. Rolph, "Metabolic events associated with the preparation of the fetus for independent life," *Ciba Found. Symp.* 86, 214 (1981).
- ¹²⁵J. Kajstura, *et al.*, "Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart," *Exp. Cell Res.* 219(1), 110 (1995).
- ¹²⁶A. A. Katzberg, B. B. Farmer, and R. A. Harris, "The predominance of binucleation in isolated rat heart myocytes," *Am. J. Anat.* 149(4), 489 (1977).
- ¹²⁷J. Kerner, *et al.*, "Phosphorylation of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I: effect on the kinetic properties of the enzyme," *J. Biol. Chem.* 279(39), 41104 (2004).
- ¹²⁸B. F. King and R. A. Hastings, "The comparative fine structure of the interhemal membrane of chorioallantoic placentas from six genera of myomorph rodents," *Am. J. Anat.* 149(2), 165 (1977).
- ¹²⁹H. G. Klemcke, "Placental metabolism of cortisol at mid- and late gestation in swine," *Biol. Reprod.* 53(6), 1293 (1995).
- ¹³⁰S. A. Kliewer, *et al.*, "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94(9), 4318 (1997).
- ¹³¹G. Krey, *et al.*, "Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay," *Mol. Endocrinol.* 11(6), 779 (1997).
- ¹³²M. Kuang, *et al.*, "Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia," *Circulation* 109(12), 1550 (2004).
- ¹³³C. A. LANG, "RESPIRATORY ENZYMES IN THE HEART AND LIVER OF THE PRENATAL AND POSTNATAL RAT," *Biochem. J.* 95, 365 (1965).
- ¹³⁴M. L. Langdown, M. J. Holness, and M. C. Sugden, "Early growth retardation induced by excessive exposure to glucocorticoids in utero selectively increases cardiac GLUT1 protein expression and Akt/protein kinase B activity in adulthood," *J. Endocrinol.* 169(1), 11 (2001).

- ¹³⁵M. L. Langdown, *et al.*, "Excessive glucocorticoid exposure during late intrauterine development modulates the expression of cardiac uncoupling proteins in adult hypertensive male offspring," *Pflugers Arch.* 442(2), 248 (2001).
- ¹³⁶C. Lau and J. M. Rogers, "Embryonic and fetal programming of physiological disorders in adulthood," *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* 72(4), 300 (2004).
- ¹³⁷E. N. Lavrentyev, D. He, and G. A. Cook, "Expression of genes participating in regulation of fatty acid and glucose utilization and energy metabolism in developing rat hearts," *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 287(5), H2035-H2042 (2004).
- ¹³⁸D. R. Laybutt, *et al.*, "Selective chronic regulation of GLUT1 and GLUT4 content by insulin, glucose, and lipid in rat cardiac muscle in vivo," *Am. J. Physiol* 273(3 Pt 2), H1309-H1316 (1997).
- ¹³⁹J. J. Lehman, *et al.*, "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis," *J. Clin. Invest* 106(7), 847 (2000).
- ¹⁴⁰R. M. Lewis, *et al.*, "Effects of maternal iron restriction in the rat on hypoxia-induced gene expression and fetal metabolite levels," *Br. J. Nutr.* 85(2), 193 (2001).
- ¹⁴¹V. Lichnovsky, *et al.*, "The role of the apoptosis and the genes regulating apoptosis in the early differentiation of human embryo," *Gen. Physiol Biophys.* 18 Suppl 1, 96 (1999).
- ¹⁴²K. Lim, M. A. Zimanyi, and M. J. Black, "Effect of maternal protein restriction in rats on cardiac fibrosis and capillarization in adulthood," *Pediatr. Res.* 60(1), 83 (2006).
- ¹⁴³S. W. Limesand, *et al.*, "Increased insulin sensitivity and maintenance of glucose utilization rates in fetal sheep with placental insufficiency and intrauterine growth restriction," *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 293(6), E1716-E1725 (2007).
- ¹⁴⁴Q. Lin, *et al.*, "Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha," *Biochemistry* 38(1), 185 (1999).
- ¹⁴⁵L. D. Longo, "The biological effects of carbon monoxide on the pregnant woman, fetus, and newborn infant," *Am. J. Obstet. Gynecol.* 129(1), 69 (1977).
- ¹⁴⁶G. D. Lopaschuk, *et al.*, "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease," *Physiol Rev.* 90(1), 207 (2010).
- ¹⁴⁷J. J. Luiken, *et al.*, "Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters," *Pflugers Arch.* 448(1), 1 (2004).
- ¹⁴⁸F. Luo, *et al.*, "Hypoxia-inducible transcription factor-1alpha promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway," *BMC. Cancer* 6, 26 (2006).
- ¹⁴⁹A. L. Magnusson, *et al.*, "Glucose metabolism in the human preterm and term placenta of IUGR fetuses," *Placenta* 25(4), 337 (2004).
- ¹⁵⁰A. L. Magnusson, *et al.*, "Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and diabetes," *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89(9), 4607 (2004).
- ¹⁵¹S. D. Mahajan, *et al.*, "Endocrine regulation in asymmetric intrauterine fetal growth retardation," *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 19(10), 615 (2006).
- ¹⁵²D. Mahendran, *et al.*, "Amino acid (system A) transporter activity in microvillous membrane vesicles from the placentas of appropriate and small for gestational age babies," *Pediatr. Res.* 34(5), 661 (1993).
- ¹⁵³N. Majewski, *et al.*, "Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak," *Mol. Cell* 16(5), 819 (2004).

- ¹⁵⁴R. Malhotra and F. C. Brosius, III, "Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes," *J. Biol. Chem.* 274(18), 12567 (1999).
- ¹⁵⁵M. Marcil, *et al.*, "Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress," *J. Mol. Cell Cardiol.* 41(6), 998 (2006).
- ¹⁵⁶A. M. Marconi, *et al.*, "An evaluation of fetal glucogenesis in intrauterine growth-retarded pregnancies," *Metabolism* 42(7), 860 (1993).
- ¹⁵⁷A. M. Marconi, *et al.*, "The impact of gestational age and fetal growth on the maternal-fetal glucose concentration difference," *Obstet. Gynecol.* 87(6), 937 (1996).
- ¹⁵⁸G. Massicotte, *et al.*, "Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during gestation in normotensive and spontaneously hypertensive rats," *Can. J. Physiol Pharmacol.* 65(12), 2466 (1987).
- ¹⁵⁹T. Matsusaka, *et al.*, "Communication between myocytes and fibroblasts in cardiac remodeling in angiotensin chimeric mice," *J. Clin. Invest* 103(10), 1451 (1999).
- ¹⁶⁰T. M. Mayhew, *et al.*, "Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction," *Placenta* 24(2-3), 219 (2003).
- ¹⁶¹T. M. Mayhew, *et al.*, "Stereological estimates of nuclear number in human ventricular cardiomyocytes before and after birth obtained using physical disectors," *J. Anat.* 191 (Pt 1), 107 (1997).
- ¹⁶²R. A. McCance and E. M. Widdowson, "The determinants of growth and form," *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 185(78), 1 (1974).
- ¹⁶³P. O. McGowan and M. Szyf, "The epigenetics of social adversity in early life: implications for mental health outcomes," *Neurobiol. Dis.* 39(1), 66 (2010).
- ¹⁶⁴J. M. Medina, "The role of lactate as an energy substrate for the brain during the early neonatal period," *Biol. Neonate* 48(4), 237 (1985).
- ¹⁶⁵E. Merki, *et al.*, "Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102(51), 18455 (2005).
- ¹⁶⁶K. Meyer and Zhang Lubo, "Fetal programming of cardiac function and disease," *Reprod. Sci.* 14(3), 209 (2007).
- ¹⁶⁷L. Miquerol, B. L. Langille, and A. Nagy, "Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression," *Development* 127(18), 3941 (2000).
- ¹⁶⁸C. Montessuit and A. Thorburn, "Transcriptional activation of the glucose transporter GLUT1 in ventricular cardiac myocytes by hypertrophic agonists," *J. Biol. Chem.* 274(13), 9006 (1999).
- ¹⁶⁹T. J. Moss, *et al.*, "Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure," *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 281(3), R960-R970 (2001).
- ¹⁷⁰K. Motojima, *et al.*, "Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner," *J. Biol. Chem.* 273(27), 16710 (1998).
- ¹⁷¹M. Nagao, B. Parimoo, and K. Tanaka, "Developmental, nutritional, and hormonal regulation of tissue-specific expression of the genes encoding various acyl-CoA dehydrogenases and alpha-subunit of electron transfer flavoprotein in rat," *J. Biol. Chem.* 268(32), 24114 (1993).

- ¹⁷²S. Nagata, "Fas ligand-induced apoptosis," *Annu. Rev. Genet.* 33, 29 (1999).
- ¹⁷³H. Nakagami, M. Takemoto, and J. K. Liao, "NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy," *J. Mol. Cell Cardiol.* 35(7), 851 (2003).
- ¹⁷⁴T. Noguchi, H. Inoue, and T. Tanaka, "The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing," *J. Biol. Chem.* 261(29), 13807 (1986).
- ¹⁷⁵T. Noguchi and T. Tanaka, "[Gene analysis and genetic diagnosis of hereditary erythrocyte abnormalities. Pyruvate kinase deficiency]," *Nippon Rinsho* 45(12), 2899 (1987).
- ¹⁷⁶R. T. Nolte, *et al.*, "Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma," *Nature* 395(6698), 137 (1998).
- ¹⁷⁷S. Norberg, T. L. Powell, and T. Jansson, "Intrauterine growth restriction is associated with a reduced activity of placental taurine transporters," *Pediatr. Res.* 44(2), 233 (1998).
- ¹⁷⁸M. J. Nyirenda, *et al.*, "Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring," *J. Clin. Invest* 101(10), 2174 (1998).
- ¹⁷⁹J. M. O'Donnell, *et al.*, "Coupling of mitochondrial fatty acid uptake to oxidative flux in the intact heart," *Biophys. J.* 82(1 Pt 1), 11 (2002).
- ¹⁸⁰N. A. Oey, *et al.*, "Fatty acid oxidation in the human fetus: implications for fetal and adult disease," *J. Inherit. Metab. Dis.* 29(1), 71 (2006).
- ¹⁸¹A. Onay-Besikci, "Regulation of cardiac energy metabolism in newborn," *Mol. Cell Biochem.* 287(1-2), 1 (2006).
- ¹⁸²A. Onay-Besikci, *et al.*, "Relative importance of malonyl CoA and carnitine in maturation of fatty acid oxidation in newborn rabbit heart," *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 284(1), H283-H289 (2003).
- ¹⁸³S. Oparil, S. P. Bishop, and F. J. Clubb, Jr., "Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia," *Hypertension* 6(6 Pt 2), III38-III43 (1984).
- ¹⁸⁴M. Osada-Oka, *et al.*, "Glucose is necessary for stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha under hypoxia: contribution of the pentose phosphate pathway to this stabilization," *FEBS Lett.* 584(14), 3073 (2010).
- ¹⁸⁵J. Osterman, P. J. Fritz, and T. Wuntch, "Pyruvate kinase isozymes from rat tissues. Developmental studies," *J. Biol. Chem.* 248(3), 1011 (1973).
- ¹⁸⁶J. Paquin, *et al.*, "Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99(14), 9550 (2002).
- ¹⁸⁷J. G. Pastorino and J. B. Hoek, "Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis," *Curr. Med. Chem.* 10(16), 1535 (2003).
- ¹⁸⁸D. J. Pennisi, V. L. Ballard, and T. Mikawa, "Epicardium is required for the full rate of myocyte proliferation and levels of expression of myocyte mitogenic factors FGF2 and its receptor, FGFR-1, but not for transmural myocardial patterning in the embryonic chick heart," *Dev. Dyn.* 228(2), 161 (2003).
- ¹⁸⁹J. M. Pfeffer, *et al.*, "Favorable effects of therapy on cardiac performance in spontaneously hypertensive rats," *Am. J. Physiol* 242(5), H776-H784 (1982).
- ¹⁹⁰R. E. Poelmann, *et al.*, "Apoptosis in cardiac development," *Cell Tissue Res.* 301(1), 43 (2000).

- ¹⁹¹P. Portela, S. Moreno, and S. Rossi, "Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a protein kinase A substrate, and specificity of the phosphorylation site sequence in the whole protein," *Biochem. J.* 396(1), 117 (2006).
- ¹⁹²O. W. Portman, R. E. Behrman, and P. Soltys, "Transfer of free fatty acids across the primate placenta," *Am. J. Physiol* 216(1), 143 (1969).
- ¹⁹³C. Postic, *et al.*, "Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat," *Am. J. Physiol* 266(4 Pt 1), E548-E559 (1994).
- ¹⁹⁴M. Rajabi, *et al.*, "Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis," *Heart Fail. Rev.* 12(3-4), 331 (2007).
- ¹⁹⁵P. J. Randle, "Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years," *Diabetes Metab Rev.* 14(4), 263 (1998).
- ¹⁹⁶R. Rembiesa, "Biosynthesis, metabolism and regulation of steroid hormones secretion in the placental phase of gestation in the rat," *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* 36(2-3), 187 (1984).
- ¹⁹⁷B. S. Richardson, *et al.*, "Fetal cerebral, circulatory, and metabolic responses during heart rate decelerations with umbilical cord compression," *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175(4 Pt 1), 929 (1996).
- ¹⁹⁸C. S. Rogers and D. E. Morse, "Atrial septation in the rat. II. An electron microscopic study," *J. Submicrosc. Cytol.* 18(2), 325 (1986).
- ¹⁹⁹T. J. Roseboom, *et al.*, "Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview," *Twin. Res.* 4(5), 293 (2001).
- ²⁰⁰P. Rosso, *et al.*, "Maternal hemodynamic adjustments in idiopathic fetal growth retardation," *Gynecol. Obstet. Invest* 35(3), 162 (1993).
- ²⁰¹E. Roy-Clavel, *et al.*, "Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats," *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180(3 Pt 1), 608 (1999).
- ²⁰²M. N. Sack, *et al.*, "Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart," *Circulation* 94(11), 2837 (1996).
- ²⁰³S. P. Salas, *et al.*, "Maternal plasma volume expansion and hormonal changes in women with idiopathic fetal growth retardation," *Obstet. Gynecol.* 81(6), 1029 (1993).
- ²⁰⁴T. Santalucia, *et al.*, "Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle," *J. Biol. Chem.* 274(25), 17626 (1999).
- ²⁰⁵J. E. Schaffer and H. F. Lodish, "Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein," *Cell* 79(3), 427 (1994).
- ²⁰⁶T. Schirmer and P. R. Evans, "Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase," *Nature* 343(6254), 140 (1990).
- ²⁰⁷R. W. Schwenk, *et al.*, "Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease," *Cardiovasc. Res.* 79(2), 249 (2008).
- ²⁰⁸P. A. Scott, *et al.*, "Gestation-induced uterine vascular remodeling," *Methods Mol. Biol.* 550, 103 (2009).
- ²⁰⁹M. A. Selak, *et al.*, "Impaired oxidative phosphorylation in skeletal muscle of intrauterine growth-retarded rats," *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 285(1), E130-E137 (2003).
- ²¹⁰G. L. Semenza, *et al.*, "Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1," *J. Biol. Chem.* 269(38), 23757 (1994).
- ²¹¹B. Shivalkar, *et al.*, "Repeated stunning precedes myocardial hibernation in progressive multiple coronary artery obstruction," *J. Am. Coll. Cardiol.* 34(7), 2126 (1999).
- ²¹²R. Simmons, "Perinatal programming of obesity," *Exp. Gerontol.* 40(11), 863 (2005).

- ²¹³T. A. Slotkin, *et al.*, "Impaired cardiac function during postnatal hypoxia in rats exposed to nicotine prenatally: implications for perinatal morbidity and mortality, and for sudden infant death syndrome," *Teratology* 55(3), 177 (1997).
- ²¹⁴L. A. Sordahl, *et al.*, "Some ultrastructural and biochemical aspects of heart mitochondria associated with development: fetal and cardiomyopathic tissue," *J. Mol. Cell Cardiol.* 4(1), 1 (1972).
- ²¹⁵R. Southworth, *et al.*, "A reevaluation of the roles of hexokinase I and II in the heart," *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 292(1), H378-H386 (2007).
- ²¹⁶J. St-Louis and M. Brochu, "[The cardiovascular paradox of pregnancy]," *Med. Sci. (Paris)* 23(11), 944 (2007).
- ²¹⁷W. C. Stanley, *et al.*, "Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions," *Cardiovasc. Res.* 33(2), 243 (1997).
- ²¹⁸T. Stephenson, J. Stammers, and D. Hull, "Placental transfer of free fatty acids: importance of fetal albumin concentration and acid-base status," *Biol. Neonate* 63(5), 273 (1993).
- ²¹⁹S. C. Stoica, *et al.*, "The energy metabolism in the right and left ventricles of human donor hearts across transplantation," *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 23(4), 503 (2003).
- ²²⁰A. Strasser, L. O'Connor, and V. M. Dixit, "Apoptosis signaling," *Annu. Rev. Biochem.* 69, 217 (2000).
- ²²¹A. Strasser, *et al.*, "The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control," *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917, 541 (2000).
- ²²²I. Stuckmann, S. Evans, and A. B. Lassar, "Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation," *Dev. Biol.* 255(2), 334 (2003).
- ²²³D. R. Studelska, *et al.*, "Developmental expression of insulin-regulatable glucose transporter GLUT-4," *Am. J. Physiol* 263(1 Pt 1), E102-E106 (1992).
- ²²⁴H. Sun, H. Wang, and S. Hu, "Effects of estrogen on diverse stem cells and relevant intracellular mechanisms," *Sci. China Life Sci.* 53(5), 542 (2010).
- ²²⁵M. Szyf, "Early life, the epigenome and human health," *Acta Paediatr.* 98(7), 1082 (2009).
- ²²⁶S. Tabano, *et al.*, "Placental LPL gene expression is increased in severe intrauterine growth-restricted pregnancies," *Pediatr. Res.* 59(2), 250 (2006).
- ²²⁷M. Takenaka, *et al.*, "Rat pyruvate kinase M gene. Its complete structure and characterization of the 5'-flanking region," *J. Biol. Chem.* 264(4), 2363 (1989).
- ²²⁸M. Takenaka, *et al.*, "Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene," *Eur. J. Biochem.* 198(1), 101 (1991).
- ²²⁹A. Tardif, *et al.*, "Stimulation of glucose uptake by chronic vanadate pretreatment in cardiomyocytes requires PI 3-kinase and p38 MAPK activation," *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 284(6), E1055-E1064 (2003).
- ²³⁰K. L. Thornburg, "Hypoxia and cardiac programming," *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10(5), 251 (2003).
- ²³¹S. Z. Tomas, *et al.*, "Morphological characteristics of placentas associated with idiopathic intrauterine growth retardation: a clinicopathologic study," *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* (2010).
- ²³²Tortora J.R. and Grabowski S.R., "Chapitre 25 : Le Métabolisme," in *Éditions du nouveau pédagogique ed.*(John Wiley & Sons, Inc., St-Laurent, 2001), pp.924-970.

- ²³³Tortora J.R. and Grabowski S.R., "Chapitre 29 : Le Développement Prénatal La Naissance Et L'Hérédité,"in Éditions du nouveau pédagogique Inc. ed.(John Wiley & Sons, Inc., St-Laurent, 2001), pp.1087-1121.
- ²³⁴A. E. Tsirka, *et al.*, "Myocardial gene expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 4 in response to uteroplacental insufficiency in the rat," *J. Endocrinol.* 169(2), 373 (2001).
- ²³⁵H. Ulger, *et al.*, "The effect of vascular endothelial growth factor on in vitro embryonic heart development in rats," *Anat. Histol. Embryol.* 33(6), 334 (2004).
- ²³⁶M. J. van den Hoff, *et al.*, "Programmed cell death in the developing heart," *Cardiovasc. Res.* 45(3), 603 (2000).
- ²³⁷K. A. Van Der Lee, *et al.*, "Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes," *J. Lipid Res.* 41(1), 41 (2000).
- ²³⁸K. A. Van Der Lee, *et al.*, "Effects of fatty acids on uncoupling protein-2 expression in the rat heart," *FASEB J.* 14(3), 495 (2000).
- ²³⁹G. J. Van der Vusse, Bilsen M. van, and J. F. Glatz, "Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease," *Cardiovasc. Res.* 45(2), 279 (2000).
- ²⁴⁰Bilsen M. van, J. E. de Vries, and G. J. Van der Vusse, "Long-term effects of fatty acids on cell viability and gene expression of neonatal cardiac myocytes," *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 57(1), 39 (1997).
- ²⁴¹Eunen K. van, *et al.*, "Measuring enzyme activities under standardized in vivo-like conditions for systems biology," *FEBS J.* 277(3), 749 (2010).
- ²⁴²Eunen K. van, *et al.*, "Measuring enzyme activities under standardized in vivo-like conditions for systems biology," *FEBS J.* 277(3), 749 (2010).
- ²⁴³A. Vazquez, *et al.*, "Impact of limited solvent capacity on metabolic rate, enzyme activities, and metabolite concentrations of *S. cerevisiae* glycolysis," *PLoS. Comput. Biol.* 4(10), e1000195 (2008).
- ²⁴⁴A. Vazquez, *et al.*, "Impact of limited solvent capacity on metabolic rate, enzyme activities, and metabolite concentrations of *S. cerevisiae* glycolysis," *PLoS. Comput. Biol.* 4(10), e1000195 (2008).
- ²⁴⁵L. Vercruyssen, *et al.*, "Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat," *Placenta* 27(1), 22 (2006).
- ²⁴⁶M. H. Vickers, *et al.*, "Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition," *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 285(1), R271-R273 (2003).
- ²⁴⁷D. Voet and J. G. Voet, "Chapitre 17 : La Glycolyse,"in Éditions de Boeck Université ed.(John Wiley & Sons,Inc., Espagne, 2005), pp.581-625.
- ²⁴⁸D. Voet and J. G. Voet, "Chapitre 21 : Le Cycle De L'Acide Citrique,"in Éditions de Boeck Université ed.(John Wiley & Sons, Inc., Espagne, 2005), pp.765-796.
- ²⁴⁹D. Voet and J. G. Voet, "Chapitre 22 : Transport Des Électrons Et Phosphorylations Oxydatives,"in Éditions de Boeck Université ed.(John Wiley & Sons, Inc., Espagne, 2005), pp.797-842.
- ²⁵⁰D. Voet and J. G. Voet, "Chapitre 25 : Métabolisme Des Lipides,"in Éditions de Boeck Université ed.(John Wiley & Sons, Inc., Espagne, 2005), pp.909-984.
- ²⁵¹D. Voet and J. G. Voet, "Chapitre 34 : L'Expression Des Gènes Eucaryotiques,"in Éditions de Boeck Université ed.(John Wiley & Sons, Inc., Espagne, 2005), pp.1422-1523.

- ²⁵²M. P. Vrancken Peeters, *et al.*, "Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium," *Anat. Embryol. (Berl)* 199(4), 367 (1999).
- ²⁵³C. Wadsack, *et al.*, "Intrauterine growth restriction is associated with alterations in placental lipoprotein receptors and maternal lipoprotein composition," *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 292(2), E476-E484 (2007).
- ²⁵⁴R. J. Wanders, "Peroxisomes, lipid metabolism, and human disease," *Cell Biochem. Biophys.* 32 Spring, 89 (2000).
- ²⁵⁵B. P. Wann, *et al.*, "Behavioural signs of depression and apoptosis in the limbic system following myocardial infarction: effects of sertraline," *J. Psychopharmacol.* 23(4), 451 (2009).
- ²⁵⁶B. P. Wann, *et al.*, "Apoptosis detected in the amygdala following myocardial infarction in the rat," *Biol. Psychiatry* 59(5), 430 (2006).
- ²⁵⁷K. T. Weber and C. G. Brilla, "Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system," *Circulation* 83(6), 1849 (1991).
- ²⁵⁸J. C. Werner, *et al.*, "Perinatal changes in mitochondrial respiration of the rabbit heart," *Biol. Neonate* 42(5-6), 208 (1982).
- ²⁵⁹K. Wildenthal, "Maturation of responsiveness to cardioactive drugs. Differential effects of acetylcholine, norepinephrine, theophylline, tyramine, glucagon, and dibutyryl cyclic AMP on atrial rate in hearts of fetal mice," *J. Clin. Invest* 52(9), 2250 (1973).
- ²⁶⁰J. E. Wilson, "Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function," *J. Exp. Biol.* 206(Pt 12), 2049 (2003).
- ²⁶¹J. A. Wisneski, *et al.*, "Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with ¹⁴C-labeled substrates in humans," *J. Clin. Invest* 79(2), 359 (1987).
- ²⁶²E. M. Wright, *et al.*, "Regulation of Na⁺/glucose cotransporters," *J. Exp. Biol.* 200(Pt 2), 287 (1997).
- ²⁶³A. H. Wyllie, J. F. Kerr, and A. R. Currie, "Cell death: the significance of apoptosis," *Int. Rev. Cytol.* 68, 251 (1980).
- ²⁶⁴Y. Xiao, *et al.*, "Maternal cocaine administration during pregnancy induces apoptosis in fetal rat heart," *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37(6), 639 (2001).
- ²⁶⁵Y. Xu, *et al.*, "Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring," *FASEB J.* 20(8), 1251 (2006).
- ²⁶⁶N. Yamazaki, *et al.*, "High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone," *FEBS Lett.* 363(1-2), 41 (1995).
- ²⁶⁷M. Yoon, "The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions," *Pharmacol. Res.* 60(3), 151 (2009).
- ²⁶⁸G. S. Yu, Y. C. Lu, and T. Gulick, "Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase Ibeta gene promoters by fatty acid enzyme substrate," *J. Biol. Chem.* 273(49), 32901 (1998).
- ²⁶⁹L. Zhang, "Prenatal hypoxia and cardiac programming," *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12(1), 2 (2005).
- ²⁷⁰L. Zhang, Y. Xiao, and J. He, "Cocaine and apoptosis in myocardial cells," *Anat. Rec.* 257(6), 208 (1999).
- ²⁷¹X. Zhang, *et al.*, "Differential vulnerability to oxidative stress in rat cardiac myocytes versus fibroblasts," *J. Am. Coll. Cardiol.* 38(7), 2055 (2001).

- ²⁷²L. Zhou, *et al.*, "Human cardiomyocytes express high level of Na⁺/glucose cotransporter 1 (SGLT1)," *J. Cell Biochem.* 90(2), 339 (2003).
- ²⁷³W. Z. Zhu, *et al.*, "Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98(4), 1607 (2001).
- ²⁷⁴Y. Zhu, *et al.*, "Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma," *Gene Expr.* 6(3), 185 (1996).
- ²⁷⁵Y. Zhu, *et al.*, "Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor," *J. Biol. Chem.* 272(41), 25500 (1997).
- ²⁷⁶A. V. Zima, J. A. Copello, and L. A. Blatter, "Differential modulation of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors by NADH," *FEBS Lett.* 547(1-3), 32 (2003).
- ²⁷⁷A. Zorzano, M. A. Lasuncion, and E. Herrera, "Role of the availability of substrates on hepatic and renal gluconeogenesis in the fasted late pregnant rat," *Metabolism* 35(4), 297 (1986).
- ²⁷⁸A. Zorzano, *et al.*, "Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes," *Am. J. Cardiol.* 80(3A), 65A (1997).

6. Annexe I

ANNEXE I. Acides gras saturés et insaturés

	Nombre de carbone	Saturé	Insaturé
VLCFA	32	Acide dotriacontanoïque (lacéroïque)	
	31	Acide hentriacontanoïque	
	30	Acide triacontanoïque (mélissique)	
	29	Acide nonacosanoïque	
	28	Acide octacosanoïque (montanique)	
	27	Acide heptacosanoïque	
	26	Acide hexacosanoïque (céroïque)	
	25	Acide pentacosanoïque	
LCFA	24	Acide tétracosanoïque (lignocérique)	Acide nervonique (24:1)
	23	Acide tricosanoïque	
	22	Acide docosanoïque (béhénique)	Acide érucique (22:1) Docosahexanoïque (22:6)
	21	Acide hénicosanoïque	
	20	Acide eicosanoïque (arachidique)	Acide di-homo- γ -linoléique (20:3) Acide arachidonique (20:4) Acide éicosapentaénoïque (20:5)
	19	Acide nonadécanoïque (nonadécylique)	
	18	Acide octodécanoïque (stéarique)	Acide oléique (18:1) Acide linoléique (18:2) Acide α -linoléique (18:3) Acide γ -linoléique (18:3)
	17	Acide heptadécanoïque (margarique)	
	16	Acide hexadécanoïque (palmitique)	Acide palmitoléique (16:1)
	15	Acide pentadécanoïque (pentadécylique)	
	14	Acide tétradécanoïque (myristique)	
	MCFA	13	Acide tridécanoïque (tridécylique)
12		Acide dodécanoïque (laurique)	
11		Acide undécanoïque (undécylique)	
10		Acide décanoïque (caprique)	
9		Acide nonanoïque (pélagonique)	
8		Acide octanoïque (caprylique)	
SCFA	7	Acide heptanoïque (énanthique)	
	6	Acide hexanoïque (caproïque)	
	5	Acide pentanoïque (valérique)	
	4	Acide butanoïque (butyrique)	
	3	Acide propanoïque (propionique)	
	2	Acide éthanoïque (acétique)	
	1	Acide méthanoïque (formique)	

7. Remerciements

Il important pour moi de remercier Véronique Houde, Louise Lavoie et Daniel-Pierre Vézina pour leur aide à la correction, leur complicité et leur support. Je tiens également à remercier ma famille et mes amis qui n'ont jamais douté de mes capacités même lors des moments difficiles, lorsque moi-même j'en doutais. Ils ont toujours su me montrer leur fierté, leur optimisme et leurs encouragements.

Un merci incommensurable au docteur Michèle Brochu, ma directrice de recherche, qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire afin que je puisse effectuer les travaux de ma maîtrise. Elle a su me faire confiance, en me laissant conduire mon propre projet de façon personnelle, en me supportant en cas de besoin. Elle a aussi été d'un aide essentiel à la rédaction de cet écrit.

Je tiens à remercier personnellement chacun de mes collègues membres du laboratoire pour leur support moral, technique et leur aide précieuse. Ils ont de plus, et surtout, su écouter et rire avec complicité de mes histoires rocambolesques hors du commun, ainsi que m'aider à parfaire mes connaissances en géographie. Merci Véronique, Étienne, Mylène, Leslie, Mathieu, Pascale, Pierre-André, Benoit et Karine.

Pour terminer, un merci tout particulier aux évaluateurs pour leurs commentaires et corrections. Sans eux, mon mémoire ne pourrait être complet; imbriquée dans une vision personnelle d'un projet, un regard externe éclaire certaines failles invisibles à l'écrivaine.

Vivre, est le fruit du hasard du temps suite à l'accomplissement sentimental entre 2 êtres. Mourir est la conformation à la loi de la nature. Choisir de vivre comme on le désire, tient de la mise en application du libre-arbitre, de la débrouillardise, de la motivation et de l'obstination