NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
Le 25 Novembre 2024

Morgane EHRHARD

Environnement et régulation génétique du développement cardiaque : Incidence de l'obésité maternelle

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Biologie du Développement

École doctorale
ED62 – Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
Marseille Medical Genetics (MMG) – U1251

Composition du jury

Nathalie GABORIT L'institut du thorax - Nantes	Rapporteure
Anne GARNIER-FAGART U1180 INSERM - Paris-Saclay	Rapporteure
Thomas MOORE-MORRIS IGF - Montpellier	Examinateur
Christophe PORCHER AMU-INMED- Marseille	Président du jury
Magali THÉVENIAU-RUISSY AMU-MMG- Marseille	Directrice de thèse

Affidavit

Je soussignée, Morgane Ehrhard, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de THEVENIAU RUISSY Magali dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 9 septembre 2024



Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

    1. Congenital heart defects related to maternal obesity. Morgane Ehrhard, Mayyasa Rammah, Robert G Kelly, Francesca Rochais and Magali Théveniau-Ruissy. *En cours de soumission*

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

    1. Congrès Printemps de la Cardiologie du 24 au 26 mai 2023 Société Française de cardiologie, Marseille (flash talk)

    2. 30ème édition du colloque de l'Ecole Doctorale 62 du 30 au 31 Mai 2023 (poster)

    3. Congrès organisé par les doctorants du MMG le 20 octobre 2023 (présentation orale)

Résumé

L'obésité maternelle est de plus en plus reconnue comme un facteur déterminant dans le développement embryonnaire, en particulier pour la santé cardiaque des nouveau-nés. Des recherches antérieures ont mis en évidence une corrélation entre les régimes alimentaires riches en graisses (HFD) pendant la gestation et un risque accru de malformations cardiaques congénitales (CHD) touchant la région conotroncale, où l'aorte et le tronc pulmonaire se rejoignent. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires expliquant le lien entre l'obésité maternelle et un risque accru de CHD affectant le développement du pôle artériel du cœur demeurent inconnus. Aux stades précoces de développement le pôle artériel du cœur, dit outflow tract (OFT), requiert l'ajout des cellules progénitrices du second champ cardiaque (SHF). Le récepteur lipidique Pparγ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) a été identifié comme un régulateur clé de l'identité de l'OFT et démontré comme requis dans les progéniteurs cardiaques pour le développement du pôle artériel du cœur (Rammah *et al.*, Circ.Res, 2022).

L'ensemble de ces données suggèrent que l'obésité maternelle impacte précocement le développement embryonnaire, en particulier les cellules du SHF, et que dans ces conditions, *Pparγ* joue un rôle critique.

Nous avons donc développé un modèle de souris femelles rendues obèses par un régime riche en acides gras et étudié l'impact de l'obésité maternelle sur le développement cardiaque.

Nous avons observé que les embryons issus de femelles obèses présentent une prédisposition à des défauts cardiaques congénitaux. Certains embryons meurent précocement, un pic de léthalité est identifié à mi-gestation. Des défauts d'élongation de l'OFT sont observés dès le stade de 9 jours embryonnaires. L'accumulation de vésicules lipidiques dans l'OFT ainsi que l'expression accrue des gènes de transport et de stockage des lipides tels que *Pparγ*, *Perilipin4* et *Perilipin5* suggèrent que *Pparγ*, senseur lipidique, est impliqué dans le développement des CHD secondaires à l'obésité maternelle. Les études des CHD liées à l'obésité maternelle dans un contexte du mutant *Mesp1-Cre;Pparγ*$^{fl/fl}$ ont été réalisées. Les résultats obtenus mettent en évidence un rôle protecteur de la réduction d'expression de *Pparγ* en situation HFD. L'ensemble de nos données nous ont amené à étudier le profil métabolique du cœur embryonnaire dès le stade E9.5. Nous avons observé une dynamique précoce de la chaine respiratoire mitochondriale dans la région de l'OFT et des ventricules.

Cette étude démontre que l'obésité maternelle, induite par un apport riche en gras, affecte précocement le développement cardiaque. Les cellules progénitrices sont impactées dès les stades précoces du développement embryonnaire et *Pparγ* paraît impliqué dans ce processus.

En conclusion, des études plus approfondies des mécanismes impliqués dans ces altérations seront essentielles pour développer des stratégies de prévention et de traitement efficaces dont notamment l'étude de la fonction de *Pparγ*.

Mots clés : Développement cardiaque, Obésité maternelle, PPAR gamma, Défauts cardiaques congénitaux, Respiration mitochondriale.

Abstract

Maternal obesity is increasingly recognized as a critical risk factor for a proper embryonic development, as well as for the cardiovascular health of the newborn Previous research has demonstrated a correlation between high-fat diets (HFDs) of the mother during gestation and an increased risk of congenital heart defects (CHDs). The most affected region is often the conotruncal region, which includes both the aorta and the pulmonary trunk. However, the molecular and cellular mechanisms mediating the impact of maternal obesity on the occurrence of CHD including defects in development of the arterial pole of the heart remain unknown. Early stages of development of the arterial pole of the heart, the so-called outflow tract (OFT), require the addition of progenitor cells from the second heart field (SHF). The lipid receptor Pparγ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) has been identified as a key regulator of OFT cell identity and required in cardiac progenitors for the development of the arterial pole of the heart (Rammah et al., Circ. Res, 2022).

All these data suggest that maternal obesity impacts early embryonic development, particularly commitment and/or determination HF cells, and that Pparγ plays a critical role in this process.

We therefore used a mouse model of maternal obesity induced by feeding the mice with a HFD to investigate the impact of maternal obesity on cardiac development.

We observed that embryos from HFD females have a predisposition to CHD. Embryos die early by mid-gestation. AT E9.5, OFT elongation defects are observed and lipid vesicles accumulation is detected in the OFT. Increase of the lipid transport and of expression of lipid storage genes such as Pparγ, Perilipin4 and Perilipin5 suggest that Pparγ, as a lipid sensor gene, is involved in the development of CHD secondary to maternal obesity. We looked at CHD occurrence related to maternal obesity in the absence of of Pparg using Mesp1-Cre;Pparγfl/fl mutants. The protective role of reduction in Pparγ expression in HFD situation was observed. Altogether, these data led us to further study the metabolic profile of the embryonic heart from the E9.5 stage. We observed an early dynamic of the mitochondrial respiratory chain activity in the OFT region and ventricles. This study demonstrates that maternal obesity, induced by a high-fat intake, affects early cardiac development. Progenitor cells are impacted from the early stages and Pparγ is be involved in this process.

In conclusion, further studies of the mechanisms involved in these alterations will be essential for the development of effective prevention and treatment strategies, including the study of Pparγ function.

Keywords: Cardiac développement, Maternal obesity, PPAR gamma, Congenital heart defects, Mitochondrial respiration.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à tous les membres de mon jury de thèse, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche. Je remercie sincèrement le Professeur Christophe PORCHER d'avoir accepté de présider le jury, mais également pour son soutien lors de la médiation qui a été longue et laborieuse. Mes remerciements vont également au Dr. Nathalie GABORIT et au Pr. Anne GARNIER-FAGART pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci aussi au Dr. Thomas MOORE-MORRIS pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Anne Garnier, Mathias Mericskay et Iman Momken pour leur précieuse aide et leur expertise lors de nos missions à Paris.

Mes remerciements vont également à Nathalie E. ancienne membre de l'équipe pour nos galères partagées et pour ton accompagnement, et la garde des chats ! Ainsi qu'à Sinem for your constante happiness.

Je remercie aussi les filles de la plateforme IPS Claire, Sara et Ola qui m'ont accueilli les bras ouverts dans leurs bureaux et qui ont pris soin de moi et de mon petit cactus. Franchement, j'y étais au top 😉!

Audrey avec qui j'ai passé tant de bons moments… Tout le monde devrait avoir une Audrey dans sa vie ! Tu as été le liant qui ramenait la joie a tout le monde. On a partagé nos avancées, nos doutes et on s'est appris mutuellement les différentes techniques que l'on maîtrisait l'une et l'autre. Tu as été pour moi mon pilier le plus indéfectible durant mes deux ans de présence au labo. Tous les petits mots collés sur mon bureau, j'en ai fait une compilation que je garderai avec moi 😙. N'oublie pas de m'envoyer des vidéos de Susu de temps en temps parce qu'elle me manquera cette boulette, avec ses cachettes improbables. Par contre ces moments de chant a cappella de nuit, et les tests de résonance de l'appartement, c'est une autre histoire 😹.

Je n'oublie pas non plus mes collègues du 5em Guy, Maha, Mike, Leslie qui sont toujours souriant et qui redonnent le moral. Solène, je te soutiens de tout mon cœur, courage pour la suite et crois en toi.

Merci à Valérie pour le Neflié qui se porte à merveille, j'attends avec impatience d'avoir la première récolte ! Merci aussi pour toute l'aide administrative dont tu t'es occupée pour moi !

J'adresse mes remerciements chaleureux à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, ainsi qu'à tous ceux qui ont cru en moi et m'ont encouragée à poursuivre mes aspirations scientifiques. Votre soutien inconditionnel a été déterminant dans la concrétisation de ce projet de recherche, et je vous en suis sincèrement reconnaissante.

Un grand merci aussi aux filles du 4em Béné, Jiji, Zeinab, Camille franchement le sport le mercredi ça nous a fait du bien, plus moralement que physiquement.

Le noyau ! Audrey, Elise, Jiji, Béné et Zeinab à nous 6, on en aura organisé des événements !! On aura, je pense été les seules et uniques lapins de l'unité, ma seule déception, c'est qu'on n'ai pas reçu de réponse de Thomas Pesquet pour le congré 😄 … Bon notre guest était quand même génial ! J'ai trouvé en vous bien plus que des collègues vous êtes de vraies amies et merci pour ça.

Merci à l'équipe de Heather qui a toujours été là pour aider. Élise, je n'aurais pas assez de mots pour te dire combien je te suis reconnaissante pour tout 😘, que ce soit ton aide, ton sourire, et tout le positif que tu m'as apporté et notamment lors des moments les plus délicats. Merci d'avoir fait partie des membres de mon comité de mi thèse, j'ai eu grâce à toi la force de parler des problèmes rencontrés. J'ai pu trouver en toi une oreille bienveillante et une amie prête à tout pour aider. Merci pour ça.

Je tenais à remercier la plateforme animalerie, Keltouma et Paul pour leurs aides avec les souris, heureusement que vous étiez là pour nous apporter votre expertise.

À l’alsacienne de cœur ! Ne t’inquiète pas, nous irons brûler un cierge ensemble non pas à la bonne mère, mais à la cathédrale strasbourgeoise durant le marché de Noël 🎄 , et cette fois-ci, je te ferai la visite en personne et te montrerais tous les petits secrets que regorge ma belle ville natale. On dit chez nous que nous sommes des personnes très froides et que lorsque l’on accepte quelqu’un, c’est pour toujours. Tu le sais très bien que tu as été adopté par l’Alsace (+ Sherlock) et tu seras toujours la bienvenue.

Je n'oublie pas de remercier ma famille et mes amis, qui m'ont soutenu moralement et émotionnellement tout au long de ce parcours académique. Votre soutien inconditionnel m'a donné la force de surmonter les obstacles et de persévérer dans les moments difficiles. Votre présence réconfortante et vos mots d'encouragement ont été une source de motivation constante. Vos sacrifices et votre compréhension face à mon engagement dans ce projet de recherche ont été d'une aide plus que précieuse, et je suis profondément reconnaissante de vous avoir à mes côtés et je vous aime très fort !

Merci à ma meilleure amie Marine d’avoir été à mes côtés et de m’avoir encouragé tout ce temps. Malgré les kilomètres qui nous séparent, on est toujours restées proches. Nos 15 ans d’amitié démontrent bien la complicité qu’il y a entre nous ! Des gros bisous ma belle.

Et pour finir merci infiniment Romi, ça n’a pas dû être facile pour toi au quotidien avec cette experience bien plus dure qu’elle n’aurait dû l’être. Tu as su me porter tout ce temps ♡. Ta présence à mes cotés m’a rassurée et grâce à toi, j’ai su retrouver le sourire et la confiance en moi.

Je dédie ces travaux de recherche à Ju !
Qui nous a quitée le 06/09/2024.
Tu nous as quittée beaucoup trop tôt ma chère Cousine p.
Je n'oublierai jamais ton beau sourir, ta douceur et ta gentillesse.
Tu seras à jamais dans mon cœur !
Je t'aime



Abréviation

- A –

A : Oreillettes
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNmt : ADN mitochondrial
Ao : Aorte
AP : Pôle artériel
A-P: Antérieur – postérieur
APC : Adenomatous Polyposis Coli
AR : acide rétinoïque
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ASD : Défaut septum auriculaire
aSHF : SHF antérieur
ATP : Adénosine-triphosphate
AV : Atrio-ventriculaire
AVSD : Défaut de canal auriculo-ventriculaire

- B –

BAT : Tissu adipeux brun
BET: Bromure d'EThidium
BMP : Bone Morphogenetic Protein (protéine morphogénétique osseuse)
β-OAG : β-oxydation mitochondriale des acides gras

- C –

CAT : Tronc artériel commun
CAV : Canal auriculo-ventriculaire
CHDs : Congenital heart defects (malformations cardiaques congénitales)
CNC : Cellules de la crête neurale cardiaque
CPT-1 : Carnitine palmitoyl transférase 1

- D -

Del22q11.2 : Syndrôme de DiGeorge
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate
Dlk1 : Protéine delta-like 1
DORV : Ventricule droit à double sortie
DRP1: Dynamin-related protein 1

- E –

E : Jours embryonnaires
EAT : Tissu adipeux épicardique
EMT: Transition endothéliale-mésenchymateuse
ERR : Estrogen-related receptors
ETC : Chaîne de transport d'électrons

- F –

FA : Acide gras
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
FHF : Premier champ cardiaque
FIS1 : Fission-mediator protein 1
FISH : Hybridation *in situ* en fluorescence

- G -

G3P : Glyceraldehyde-3-phosphate
GFP: Green fluorescent protein
GLUT: GLUcose Transporter

- H –

Hes1: Hairy et enhancer of split-1
HFD: High Fat Diet (régime riche en graisses)
Hh : Hedgehog
HPRT: Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase

- I –

IMC : Indice de masse corporelle
iOFT : Voie d'écoulement inférieure
Isl1 : Islet-1

- K -

KO : Knock-out

- L –

LA : Oreillette gauche
LBD : Ligand binding domain (domaine de liaison au ligand)
LV : Ventricule gauche

- M -

Mesp1 : Mesodeilsrm Posterior Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1
mL : Millilitre

MLC2a : Myosin Light Chain 2a marquant le croissant cardiaque
mPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondriale

- N -
NaCl : Chlorure de sodium
ND: Normal Diet (régime normal)
NICD : Domaine intracellulaire Notch
NRF : Nuclear respiratory factors
NTD : Domaine N-terminal

- O –
OFT : Outflow tract (voie d'écoulement)
ON : Over Night (pendant la nuit)
OPA1 : Optic atrophic type 1 protein
OXPHOS : Complexes de phosphorylation oxydative

- P –
PAF : Paraformaldéhyde
Pb : Paire de bases
PBS : Tampon phosphate salin
PBST : PBS-tween
PCR : Réaction en chaine par polymérase
PGC1-α : Coactivateur *PPARγ-1α*
Plin5 : Périlipine 5
PPAR : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
PPRE : Eléments de réponse PPAR
pSHF: SHF postérieur
PT : Tronc pulmonaire
Ptch: Patched

- R –
RA : Oreillette droite
RAR : Récepteur de l'acide rétinoïque
RARE : Elément de réponse à l'acide rétinoïque
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RTqPCR : Rétrotranscription suivie d'une PCR quantitative
RV : Ventricule droit
RVOT : Voie d'écoulement du ventricule droit
RXR : Récepteurs rétinoïdes-X

- S –
SAN : Nœud sino-auriculaire
SGLT : Cotransporteurs sodium-glucose
SHF : Second champ cardiaque
Shh : Sonic hedgehog
Smo: Smoothened
sOFT : Voie d'écoulement supérieure

- T –
TAC : Tronc artériel commun
TBE : Tris-Borate-EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique)
Tbx1 : Facteur de transcription à boîte T
TCA : Cycle de l'acide tricarboxylique
TGA : Transposition des grandes artères
TGV : Transposition des gros vaisseaux
TOF : Tétralogie de Fallot

- U –
UCP1 : Protéine de découplage 1

- V –
Vegf : Vascular endothelial growth factor (facteur de croissance endothélial vasculaire)
VP : Pôle veineux
VSD : Ventricular septal defect (anomalie septale ventriculaire)

- W –
WAT : Tissu adipeux blanc
Wnt : Wingless-related
WT : Sauvage

- µ -
µg : Microgramme
µm : Micromètre
µM : Micromolaire

Sommaire

Affidavit *2*
Liste de publications et participation aux conférences *3*
Résumé *4*
Abstract *6*
Remerciements *7*
Sommaire *13*
Chapitre I : Le développement cardiaque *18*

A. Structure et fonction du cœur **19**
B. Le développement du cœur embryonnaire **23**
a. Du croissant cardiaque au cœur à quatre cavités 23
b. Le développement du tube cardiaque / Le premier champ cardiaque (FHF). 26
c. Le développement du pôle artériel 28
i. Le second champs cardiaque (SHF) 28
ii. La voie efférente L'OFT 31
iii. Les crêtes neurales cardiaques (CNC) 35

C. Les gènes et voies de signalisation impliqués dans le développement du pole artériel **38**
i. Les gènes impliqués dans le développement du pôle artériel 38
ii. Voies de signalisation impliquées dans le développement du pôle artériel 42

Chapitre II : Les pathologies cardiaques congénitales qui affectent le pôle artériel *61*

A. Origines génétiques **62**
i. *Tbx1*- Le syndrome de DiGeorge 63
ii. Notch Jag1 65
iii. NKX2-5 66

B. Les pathologies environnementales **66**
i. Facteurs environnementaux toxiques et leur impact sur le développement cardiaque 67

C. L'obésité maternelle **70**
i. Impact de l'obésité maternelle sur le développement de pathologies cardiaques congénitales. 71
ii. Relation entre l'obésité maternelle et les pathologies cardiaques congénitales : les lipides circulants. 73

Chapitre III : Métabolisme énergétique et développement cardiaque *75*

A. Le métabolisme énergétique **76**
a. Les Mitochondries 76
i. Généralité et rôle de la mitochondrie 76
ii. Dynamique mitochondriale 78
b. Les voies métaboliques essentielles 80
i. Glyoclyse et production d'ATP 82
i. Le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA, cycle de Krebs). 82
ii. Phosphorylation oxydative (OXPHOS) et respiration mitochondriale. 83
iii. Oxydation des acides gras dans la production d'énergie 85

B. Le métabolisme énergétique chez l'embryon et dans le développement du cœur embryonnaire 87
a. Maturation des mitochondries cardiaques dans les embryons 87
b. Interactions entre les mitochondries et le développement cardiaque 89

Chapitre IV : Les péroxysomes : Structure, Fonction et Rôle dans le développement embryonnaire 92

A. Présentation de la famille PPAR 93
B. *PPARγ* dans la différenciation des adipocytes et l'obésité 95
C. *PPARγ* dans le développement embryonnaire 98
D. *PPARγ* en tant que capteur nutritionnel 100
E. *PPARγ* dans le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriale 104

Objectifs 108
Matériel et méthodes 110
Ligné de souris, souris transgéniques, croisement et génotypage 112
Traitement des tissus 113
Immunofluorescence sur coupes de paraffine 113
Longueur de l'OFT 114
Coloration à l'Oil Red O (ORO) 114
Analyse des montages entiers et examen des anomalies cardiaques 115
Coloration à l'éosine des coupes paraffine 115
Statistiques 115
Analyse du taux de consommation d'oxygène dans le cœur embryonnaire perméabilisé 116

Résultats 118

A. Résultats - Partie I 120
i. Obésité maternelle et maladie cardiaque congénitale 120

B. Résultats - Partie II 143
i. *PPARγ* et les maladies cardiaques congénitales secondaires à l'obésité maternelle 143
ii. Régulation du statut métabolique des cellules progénitrices cardiaques dans le développement normal 159

Discussion générale et perspectives 170
Conclusion Générale 181
Liste des figures 187
Liste des Tableaux 189
Bibliographie 190

Introduction

Chapitre I : Le développement cardiaque

A. Structure et fonction du cœur

La fonction cardiaque est essentielle pour le transport de l'oxygène et des nutriments dans tout l'organisme. Le cœur est l'organe principal du système cardiovasculaire qui occupe une place centrale dans la circulation sanguine au sein de l'organisme. Au cours du développement, cet organe est le premier à être formé. Structuré de manière hautement spécialisée, il se révèle être un muscle creux et dynamique, fractionné en quatre cavités fondamentales : deux oreillettes et deux ventricules (Buckberg et al., 2018). Les oreillettes, positionnées à la partie supérieure du cœur, jouent le rôle de réservoirs sanguins, recevant le sang qui provient de la circulation générale et pulmonaire. En contrepartie, les ventricules, situés à la partie inférieure du cœur, occupent la fonction de pompe cardiaque. Leur contraction systolique assure la propulsion du sang dans les artères, permettant ainsi le transport des nutriments et de l'oxygène indispensables aux tissus (**Figure 1**). Le cœur droit, propulsant le sang désoxygéné vers les poumons, assure la récupération de l'oxygène et l'élimination du dioxyde de carbone. Par la suite, le cœur gauche prend le relais en envoyant le sang oxygéné dans les artères systémiques, nourrissant ainsi les tissus et organes du corps. Cette circulation incessante est non seulement cruciale pour soutenir les activités énergétiques des cellules, mais aussi pour éliminer les résidus métaboliques.

Au niveau micro-architectural, la fonction cardiaque est gouvernée par une complexe synchronisation d'ouverture et de fermeture des valves. Quatre d'entre elles sont responsables de maintenir le flux sanguin dans une direction spécifique, prévenant ainsi toute régurgitation. La valve aortique, entre le ventricule gauche et l'aorte, garantit un écoulement optimal vers l'aorte tandis que la valve pulmonaire, localisée entre le ventricule droit et le tronc pulmonaire, favorise l'acheminement du sang désoxygéné vers les poumons pour sa réoxygénation. Les valves tricuspide et mitrale, agissant respectivement entre l'oreillette droite et le ventricule droit, et entre l'oreillette gauche et le ventricule gauche, assurent quant à elles le bon écoulement du flux sanguin (Buckberg et al., 2008).

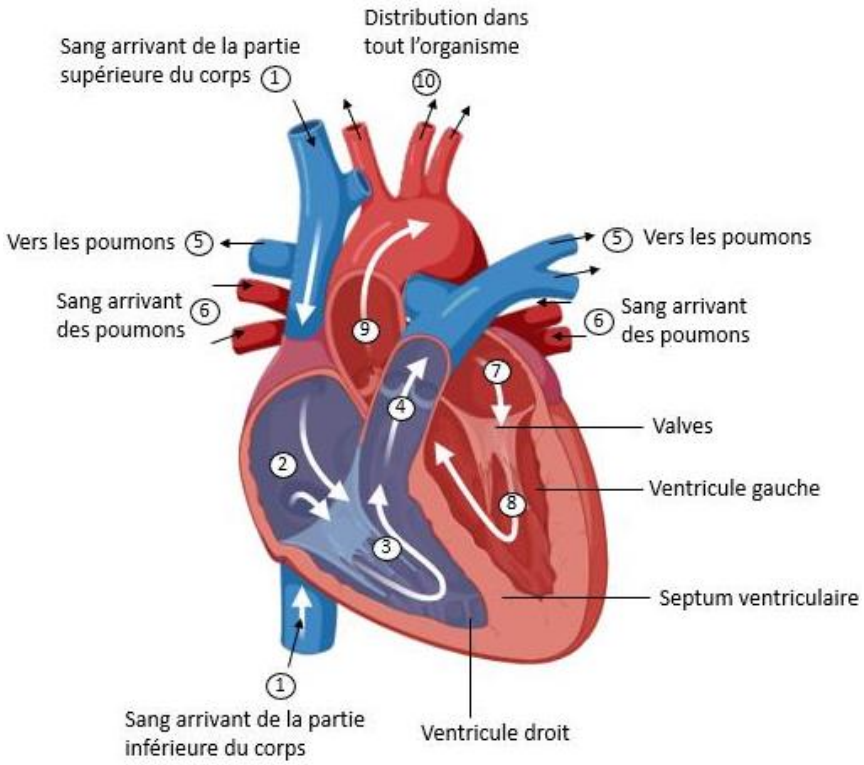


Figure 1 : Structure du cœur adulte et trajet sanguin.

(1) Le flux sanguin commence par le transport du sang désoxygéné, provenant de toutes les parties du corps, vers l'oreillette droite (2). À cet endroit, le sang pénètre dans l'oreillette droite avant que celle-ci ne se contracte pour le propulser dans le ventricule droit (3). Par la suite, la valve séparant les deux cavités se ferme et le ventricule droit se contracte, forçant le sang à être expulsé dans le tronc pulmonaire (4), ce qui entraîne la fermeture de la valve à sa base. Le sang est ainsi dirigé vers les poumons (5) une fois le sang oxygéné, celui-ci revient des poumons (6) et est acheminé vers l'oreillette gauche (7), qui à son tour se contracte pour expulser le sang dans le ventricule gauche (8). Avant la contraction du ventricule gauche, la valve entre ces deux compartiments se referme. La contraction du ventricule gauche propulse ensuite le sang dans l'aorte (9), permettant ainsi sa distribution à travers tout l'organisme (10). Les artères coronaires, qui sont alimentées par l'aorte, assurent l'approvisionnement en sang oxygéné du cœur lui-même. Les contractions cardiaques se déroulent en synchronie dans les parties droite et gauche du cœur, impliquant initialement la contraction des oreillettes droite et gauche, suivie de la contraction des ventricules droite et gauche (Figure issue de biorender).

En explorant la physiologie du cœur, il devient évident que sa performance est intrinsèquement liée à son tissu musculaire unique appelé myocarde qui est essentiellement composé de différents types de cellules, dont les fibroblastes cardiaques, des péricytes, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses cellules

musculaires striées myocardiques : les cardiomyocytes. Le myocarde se compose de 3 couches avec de l'intérieur vers l'extérieur : l'endocarde, le myocarde et le péricarde. L'endocarde est une fine couche de cellules endothéliales qui tapisse les cavités du cœur et contribue au développement des valves cardiaques, jouant un rôle crucial dans la fonction cardiaque en permettant un flux sanguin lisse à l'intérieur des chambres du cœur. Le myocarde constitue le muscle cardiaque proprement dit ; c'est un muscle strié comme les muscles des membres et avec la même force de contraction. Le Péricarde, quant à lui, est la couche externe du cœur. Il est composé de deux feuillets : un feuillet pariétal (vers l'extérieur) et un feuillet viscéral appelé épicarde (vers l'intérieur), qui constitue le mésothélium non contractile. Il migre du proépicarde et se propage sur la surface du cœur au début du développement embryonnaire et joue un rôle essentiel en tant que source de facteurs sécrétés qui influencent l'expansion des cardiomyocytes et l'assemblage des vaisseaux sanguins coronaires. Les artères coronaires, provenant de l'aorte ascendante, sont les vaisseaux principaux qui irriguent le muscle cardiaque en lui fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à son fonctionnement (Miquerol et al., 2011 ; Théveniau-Ruissy et al., 2016).

Le tissu conducteur cardiaque, également appelé système de conduction cardiaque, est essentiel pour la coordination du rythme et des contractions du cœur. Au tout début du développement cardiaque, dans le cœur tubulaire précoce, l'activité du stimulateur cardiaque commence dans la région postérieure gauche du pôle veineux. À mesure que le tube cardiaque s'allonge, cette activité se restreint progressivement au nœud sino-auriculaire (Satin et al., 1988) en formation, qui agit comme le stimulateur naturel autonome du cœur, initiant chaque cycle cardiaque. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la différenciation des cellules du stimulateur cardiaque dans le myocarde nouvellement formé impliquent une interaction complexe entre différents facteurs de transcription. L'impulsion électrique générée par le nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite, se propage à travers le tissu conducteur. Au fur et à mesure que la septation cardiaque progresse, le myocarde auriculo-ventriculaire, initialement impliqué dans la transmission de l'impulsion électrique, contribue à la formation des parois auriculaire et ventriculaire. Il est ensuite remplacé par un anneau de tissu fibreux qui isole

électriquement le myocarde ventriculaire du myocarde auriculaire, ne laissant qu'une seule voie de conduction à travers le système de conduction auriculo-ventriculaire.

Cette continuité électrique est maintenue par le nœud auriculo-ventriculaire, qui retarde la propagation de l'influx cardiaque entre les oreillettes et les ventricules. L'impulsion traverse ensuite le faisceau de His, situé au sommet du septum interventriculaire, et se propage le long des branches droite et gauche de ce faisceau, jusqu'à atteindre les fibres de Purkinje (**Figure 2**). Ces fibres, situées sur la surface sous-endocardique des parois ventriculaires, forment le système de conduction ventriculaire périphérique, qui permet une contraction synchronisée des ventricules suivant un motif de l'apex à la base du cœur (Miquerol et al., 2011). Ainsi, l'onde électrique produite par le nœud sinusal déclenche la contraction des oreillettes, puis des ventricules, assurant une circulation sanguine efficace et régulière à travers le corps. Tous les composants de ce système de conduction sont constitués de cardiomyocytes spécialisés, capables de se contracter de manière rythmique et coordonnée pour maintenir le flux sanguin optimal.

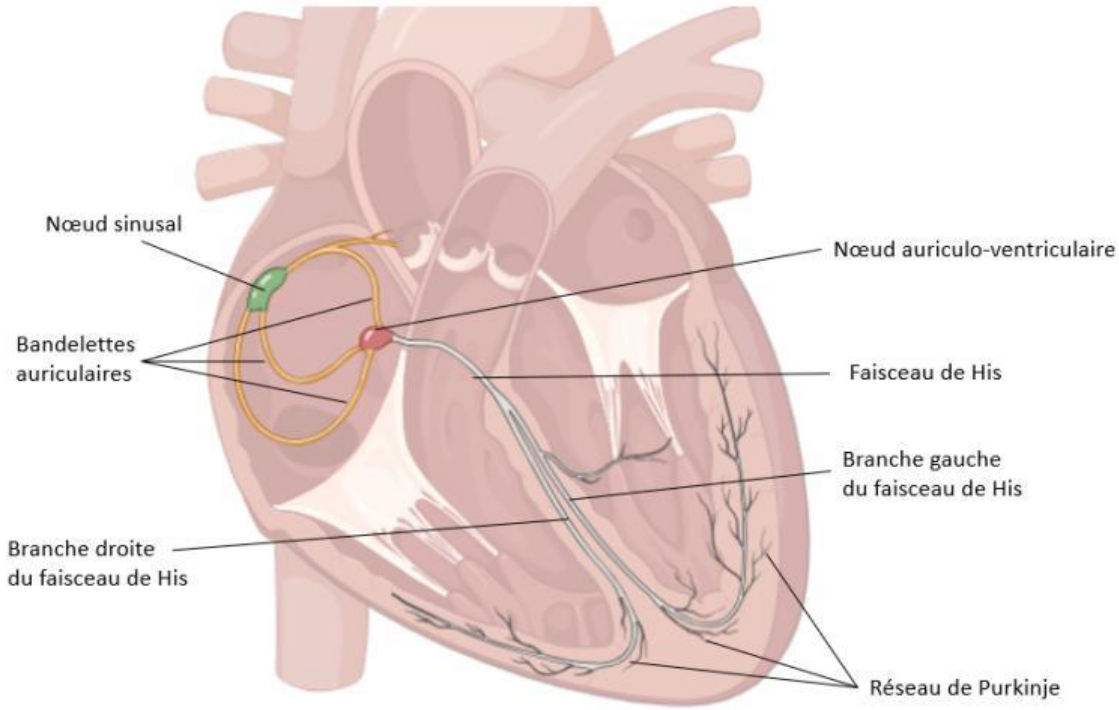


Figure 2 : Fonctionnement de la contraction cardiaque.

Le faisceau de His est une bande de fibres musculaires située dans le septum interventriculaire, transmettant les signaux électriques du nœud atrioventriculaire (AV)

aux ventricules. Une fois que les impulsions électriques atteignent le faisceau de His, elles se divisent en branches droite et gauche, se propageant le long des parois des ventricules activant ainsi les fibres de Purkinje qui sont de fines fibres musculaires ramifiées situées à la surface interne des ventricules cardiaques. Elles permettent une propagation rapide et efficace des impulsions électriques à travers les ventricules, assurant une contraction synchronisée. Les fibres de Purkinje sont capables de conduire les impulsions électriques à une vitesse bien plus élevée que les autres tissus cardiaques en raison de leur structure ramifiée et de leur forte densité de canaux ioniques (Figure issue de biorender).

B. Le développement du cœur embryonnaire

a. Du croissant cardiaque au cœur à quatre cavités

La structure et le développement cardiaques chez l'Homme et la souris présentent une forte conservation, ce qui fait du modèle murin un outil précieux pour étudier les mécanismes sous-jacents au développement cardiaque (Moon, 2008 ; Wessels et Sedmera, 2003). La gestation chez l'Homme dure environ 280 jours (9 mois), tandis que chez la souris, elle dure environ 19 à 21 jours. Chez la souris, le développement embryonnaire commence avec la formation du zygote, une cellule totipotente qui évolue en morula à E3.0, puis en blastocyste entre E3.5 et E4.5. Le blastocyste se compose de la masse cellulaire interne (futur embryon) et du trophectoderme (futur placenta). Les cellules pluripotentes de la masse cellulaire interne forment les trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme, via la gastrulation. Le cœur dérive du mésoderme. Pendant la gastrulation, l'axe antéro-postérieur de l'embryon se détermine. Les cellules pluripotentes de l'épiblaste migrent pour former la ligne primitive, rompant la symétrie embryonnaire. Elles subissent une transition épithélio-mésenchymateuse, perdent leur polarité et migrent pour former le mésoderme (Abdulla et al., 2013). La transition du croissant cardiaque aux quatre cavités représente une phase importante du développement embryonnaire, où la structure primitive du cœur se transforme en un organe complexe et fonctionnel.

Entre les jours embryonnaires (E) 6.5 et 7.5, les cellules mésodermiques cardiaques, provenant d'une première source de progéniteurs appelée le premier champ cardiaque (first heart field, FHF), migrent de l'épiblaste vers l'avant et de manière bilatérale pour former le croissant cardiaque (Zaffran et al., 2004). L'épiblaste, situé à l'intérieur du blastocyste, est une couche de cellules formée aux premiers stades du développement embryonnaire. Il joue un rôle essentiel dans la formation des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires, donnant naissance à l'embryon et à certaines parties du placenta. L'épiblaste est crucial pour l'établissement des différentes lignées cellulaires et pour la formation des structures embryonnaires primordiales. Les cellules progénitrices cardiaques entreprennent une migration depuis la lignée primitive vers la région cardiogénique, fusionnant ensuite sur la ligne médiane pour créer le croissant cardiaque. Initialement, ce croissant cardiaque ou tube cardiaque primitif, issu de l'épaississement du mésoderme, commence à subir des invaginations et des plissements, formant ainsi les bases des futures cavités cardiaques (Lescroart et al., 2014 ;Lioux et al., 2020).

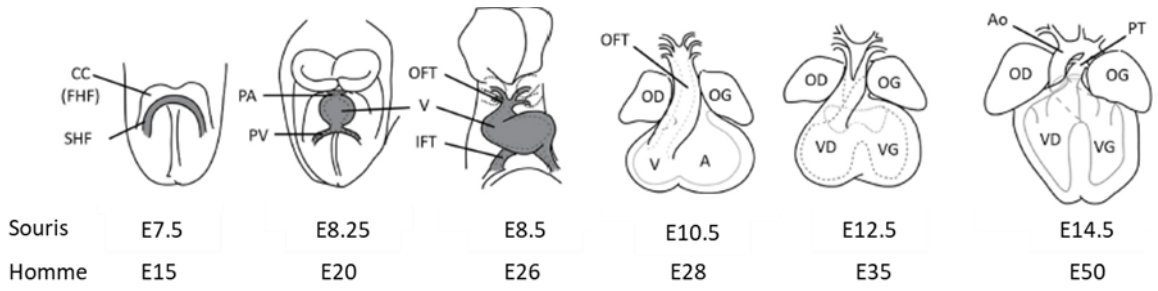


Figure 3 : Développement du cœur chez les mammifères.

Les cellules progénitrices cardiaques entreprennent une migration depuis la lignée primitive vers la région cardiogénique, fusionnant ensuite sur la ligne médiane pour créer le croissant cardiaque (E7,5). Ce dernier donne naissance à un tube cardiaque linéaire (E8,25). À partir de E8,5, le tube cardiaque connaît une rapide expansion et effectue une rotation vers la droite. Autour de E10,5, les primordia des différentes composantes du cœur se forment : les futurs ventricules gauche et droit, les oreillettes, ainsi que l'outflow tract ou voie efférente (OFT). À partir de E12,5, le cœur entre dans une phase de remodelage et de croissance, marquée par la formation des quatre cavités cardiaques grâce au développement des septa, s'en suit l'établissement des valves et à la division de la voie efférente (le pôle artériel) en deux grandes artères : l'aorte ascendante et le tronc pulmonaire. A oreillettes ; AP, pôle artériel ; LA, oreillette gauche ; LV, ventricule gauche ; OFT, voie d'écoulement ; RA, oreillette droite ; RV, ventricule droit ; Ao, aorte ; PT, tronc pulmonaire ; VP, pôle veineux. (Adapté de Kelly et Buckingham 2002.)

Au stade E7.5 le croissant cardiaque apparaît comme une couche de cellules située entre l'endoderme ventral et l'ectoderme dorsal. Au fur et à mesure que le développement progresse, le repliement rostral positionne le cœur en formation sous les plis crâniens émergents et au-dessus de la poche intestinale antérieure. Ce positionnement entraîne une déformation du croissant cardiaque, permettant la formation d'une lumière qui enveloppe les progéniteurs endocardiques. À ce stade, le croissant cardiaque augmente en hauteur et diminue en largeur, en préparation à la fusion pour former le tube cardiaque linéaire (Ivanovitch et al., 2017). À partir du stade E8.0, le croissant cardiaque fusionne sur la ligne médiane ventrale pour former un tube cardiaque linéaire à deux couches. Ce tube est composé de cardiomyocytes différenciés qui entourent une couche interne de cellules endothéliales. C'est à ce moment que la fermeture du myocarde dorsal se produit, formant un tube cardiaque complètement fermé. Ce tube est segmenté en régions morphologiquement distinctes : la voie d'éjection, le primordium du ventricule, le primordium des oreillettes, et la voie d'entrée, qui donneront naissance à des domaines spécifiques du cœur (Buijtendijk et al., 2020; Faber et al., 2019). Entre les stades E8.5 et E10.5 le tube cardiaque continue de s'allonger par l'ajout de cellules progénitrices provenant du mésoderme pharyngé aux deux pôles (Kelly et al., 2001 ; Kelly et Buckingham, 2002 ; Lioux et al., 2020).

Cette croissance progressive permet à la structure de s'allonger crânialement et caudalement. En parallèle, le tube cardiaque subit une torsion vers la droite, un processus crucial pour rapprocher les pôles cardiaques et positionner correctement les futures cavités cardiaques ainsi que leurs connexions vasculaires, dans un processus connu sous le nom de convergence. Après la formation et la torsion du tube cardiaque linéaire, celui-ci commence à s'enrouler vers la droite tout en continuant à s'allonger. L'initiation de la courbure cardiaque, représente la première rupture de symétrie morphologique gauche/droite dans l'embryon, marquant un tournant crucial dans la morphogenèse cardiaque. Avant cette étape, l'expression différentielle de gènes spécifiques gauche/droite, dans le croissant cardiaque, prépare le terrain pour cette asymétrie nécessaire à la formation des cavités cardiaques (Kawahira et al., 2020; Desgrange et al., 2020) (**Figure 3**).

Ce processus amorce la formation du cœur à quatre chambres, incluant la séparation des régions morphologiquement distinctes en cavités cardiaques spécifiques telles que les oreillettes et les ventricules. Le mésocarde dorsal, qui attachait initialement le tube cardiaque à la paroi dorsale de l'embryon, se désintègre progressivement, libérant ainsi le tube cardiaque à l'exception des pôles artériels et veineux (Le Garrec et al., 2017; Desgrange et al., 2018). Les cavités cardiaques droite et gauche commencent à se dilater, un processus connu sous le nom de ballonnement. Durant cette période, le ventricule droit se gonfle ventralement et se déplace caudalement, prenant finalement sa position sur la droite lorsque l'axe du tube cardiaque s'incline. Parallèlement, la voie d'écoulement s'allonge pour accommoder les futures grandes artères (Buijtendijk et al., 2020).

À partir du stade E10.5 et E12.5, les cavités cardiaques continuent à maturer avec la formation de crêtes myocardiques appelées trabécules. Ces trabécules émergent dans la lumière des ventricules et subissent par la suite un processus de compaction, formant une épaisse couche de myocarde. Ce processus est essentiel pour le renforcement de la paroi ventriculaire (Del Monte-Nieto et al., 2018 ; Männer and Yelbuz, 2019). Entre les stades E12.5 et E15.5, le cloisonnement auriculo-ventriculaire se met en place, entraînant la formation des cloisons auriculaires et ventriculaires ainsi que des valves mitrales et tricuspides. Ces structures sont cruciales pour l'établissement d'un système circulatoire double, avec une circulation pulmonaire et systémique distincte, et un flux sanguin unidirectionnel (Meilhac and Buckingham, 2018). Apres le stade E15.5, les stimuli mécaniques, la contractilité cellulaire, et l'hétérogénéité de la tension dans les parois cardiaques deviennent des régulateurs cruciaux pour les dernières étapes de la morphogenèse cardiaque. Ces facteurs contribuent non seulement à la finalisation de la structure cardiaque mais aussi à son fonctionnement, soulignant l'interaction étroite entre morphogenèse et fonction cardiaque (Vignes et al., 2022 ; Chow et al., 2022 ; Priya et al., 2020).

b. Le développement du tube cardiaque / Le premier champ cardiaque (FHF).

L'une des premières étapes cruciales est la gastrulation, au cours de laquelle les précurseurs cardiaques émergent et migrent latéralement depuis la région antérieure de la ligne primitive pour former le mésoderme latéral antérieur (Lawson et al., 1991 ; Meilhac and Buckingham, 2018). Cette migration se produit par vagues successives, la première vague étant étroitement associée spatialement au mésoderme crânial, et émerge généralement de la ligne primitive entre les stades embryonnaires E6.5 et 7.5. Ce processus est étroitement régulé par des gradients de signalisation, notamment les gradients de Nodal et BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), qui délimitent le mésoderme cardiaque antérieurement. Le facteur de transcription *MESP1* (Mesoderm Posterior Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1) est un marqueur précoce des cellules du mésoderme qui deviendront les progéniteurs cardiaques. *MESP1* est requis pour la délamination des cellules du mésoderme (Saga et al., 2000). Les premières cellules progénitrices myocardiques exprimant le gène codant du facteur de transcription *Mesp1* ont été identifiées comme les progéniteurs cardiaques multipotents les plus primitifs, communs aux deux champs cardiaques. Toutes les cellules du cœur et du système vasculaire dérivent de précurseurs exprimant *Mesp1* (Devine et al., 2014; Ivanovitch et al., 2021 ; Lescroart et al., 2014 ; Saga et al., 2000).

Les mouvements morphologiques associés à la gastrulation, tels que la fermeture de l'intestin, conduisent à la fusion du croissant cardiaque, formant un tube cardiaque primitif sur la ligne médiane ventrale de l'embryon. Ce tube initial, composé de cellules du FHF, est composé d'une couche externe de myocarde et d'une couche interne d'endocarde. Le tube cardiaque formé par le FHF se développe ensuite par l'addition de cellules aux deux pôles (Soufan et al., 2006 ; van den Berg et al., 2009). Les cellules du SHF initialement localisées derrière le croissant cardiaque avant sa fusion se retrouvent alors postérieurement au tube cardiaque (Cui et al., 2009).

Le FHF donne naissance aux premières cellules qui se différencient en cardiomyocytes dans le cœur et sont déjà polarisées, avec une partie antérieure devenue la voie efférente (pôle artériel) et une partie postérieure devenue la voie afférente (pôle veineux) (Buckingham et al., 2005). Sous l'influence de l'expression asymétrique de Nodal, le tube cardiaque s'enroule vers la droite. Pendant cette phase, le myocarde et l'endocarde sont séparés par une gelée cardiaque sécrétée par le myocarde, jouant un rôle crucial dans les premières fonctions cardiaques. Les processus de signalisation impliquées dans le

déploiement des cellules du premier champ cardiaque comprennent un ensemble complexe de voies moléculaires. Parmi celles-ci, on trouve le facteur de croissance des fibroblastes (Fgf), les voies Wnt/β-caténine canoniques et non canoniques, Hedgehog (Hh), Notch, la protéine morphogénétique osseuse BMP et les voies de signalisation de l'acide rétinoïque (RA) (Rochais et al., 2009 ; Kelly, 2012). L'activation des gènes régulateurs du développement cardiaque tels que *Nkx2.5* et *Gata4* dépend positivement de l'action des protéines solubles de la famille des Fgf et BMP (Brand, 2003). En revanche, la signalisation par les voies Wnt (Wingless-related) exerce un effet répressif sur ces gènes (Brand, 2003). Ainsi, un réseau complexe de gènes et de voies de signalisation est impliqué dans l'engagement et la régulation du programme de différenciation des cellules cardiaques.

c. Le développement du pôle artériel

i. Le second champs cardiaque (SHF)

Le Second Heart Field (SHF) a été identifié pour la première fois en 2001 (Kelly et al., 2001 ; Mjaatvedt et al., 2001 ; Waldo et al., 2001). Les cellules du SHF s'ajoutent progressivement au tube cardiaque par les pôles artériels et veineux, contribuant ainsi à la formation du ventricule droit, de l'outflow tract, des muscles lisses à la base des artères principales, (Waldo et al., 2001 ; Watanabe et al., 2012) et d'une partie des oreillettes (De Bono et al., 2018) (**Figure 4**). Le SHF est une population de progéniteurs cardiaques multipotentes essentielles au développement des structures cardiaques. Elles sont très prolifératives, capables de se différencier en cardiomyocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et fibroblastes (Moretti et al., Cell 2006 ; Lescroart et al., 2014 ; Miyamoto et al., 2021). Ces cellules contribuent au myocarde ventriculaire droit, au myocarde de l'outflow tract (OFT) au pôle artériel, au myocarde auriculaire, incluant la protrusion mésenchymateuse dorsale, et au pôle veineux. L'identification précise du SHF a été réalisée grâce à des techniques avancées comme l'analyse de lignées transgéniques, notamment Mlc1v-nlacZ-24 une lignée enhancer trap qui permet de localiser cette

population de manière plus médiane par rapport au croissant cardiaque (Kelly et al., 2001). Une étape clé dans la caractérisation du SHF a été l'identification d'Islet1 (Isl1) comme marqueur global de ces progéniteurs (Cai et al., 2003 ; Moretti et al., Cell 2006). L'invalidation génique d'*Isl1* chez la souris entraîne des défauts significatifs dans le développement cardiaque, soulignant son rôle crucial dans la prolifération et la survie cellulaire des progéniteurs cardiaques (Cai et al., 2003). En effet, les cellules progénitrices cardiaques chez le mutant *Isl1* ont un défaut de la prolifération et de la survie cellulaire, suggérant que ce facteur est requis pour la morphogenèse cardiaque via la migration de cellules progénitrices dans le cœur mettant ainsi en évidence son importance (Cai et al., 2003). L'expression d'*Isl1* chez la souris est complémentaire à celle du marqueur de cellules myocardiques différenciées *MLC2a* (Myosin Light Chain 2a marquant le croissant cardiaque), indiquant qu'il est seulement transcrit dans le SHF. L'analyse de lignage génétique grâce à la lignée transgénique Isl1 a montré que ce lignage participe à la formation du ventricule droit, de la voie efférente, de l'oreillette et des parties du ventricule gauche (Cai et al., 2003).

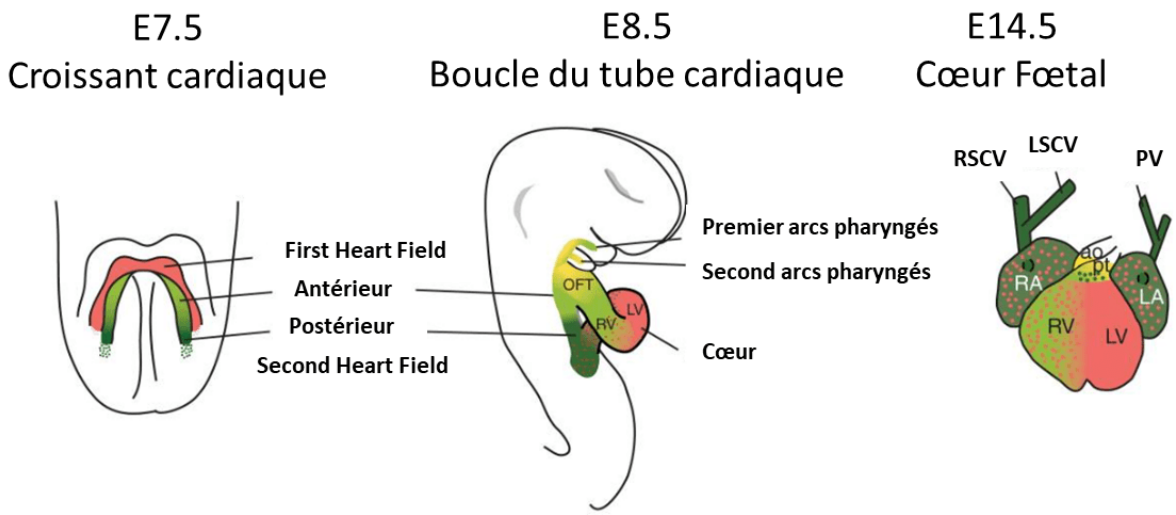


Figure 4 : Régionalisation du cœur.

Le premier champ cardiaque en rouge et le deuxième champ cardiaque en vert ainsi que les sous-domaines antérieurs (vert pâle/jaune) ou postérieurs (vert foncé) du deuxième champ cardiaque sont représentés à différents stades du développement du cœur . Les régions du cœur ayant une double origine sont représentées par des points de couleur. ao, aorte ; E, jour embryonnaire ; LA, oreillette gauche ; LSCV, veine cavalière supérieure gauche ; LV, ventricule gauche ; OFT, outflow tract; pt, tronc pulmonaire ; PV, veine pulmonaire ; RA, oreillette droite ; RSCV, veine cavalière supérieure droite ; RV, ventricule droit (Meilhac et al., 2014).

Les cellules progénitrices du SHF résident dans le mésoderme cardio-pharyngé, une région spécifique, impliquée dans le développement du cœur et des vaisseaux sanguins (Shenje et al., 2014; Diogo et al., 2015). Le mésoderme pharyngé joue un rôle central dans la formation des structures cardiaques, contribuant à des parties essentielles du cœur telles que le ventricule droit, l'OFT, et certaines parties des oreillettes. Des études ont montré que des cellules exprimant le facteur de croissance *Fgf10* dans le mésoderme pharyngé participent à la formation du pôle artériel du cœur chez la souris.

Il y a deux vagues distinctes de cellules progénitrices du SHF et de leurs dérivés (Jin et al., 2019). En effet, Le SHF présente une régionalisation selon l'axe antéro-postérieur, avec deux sous-domaines appelés SHF antérieur et postérieur, contribuant respectivement aux pôles artériel et veineux du cœur. Le SHF antérieur (aSHF) se trouve à l'avant du tube cardiaque en développement et contribue principalement à l'OFT (Lescroart et al., 2014). Le SHF postérieur (pSHF) est situé à l'arrière du tube cardiaque en développement et contribue principalement aux régions postérieures du cœur, telles que les oreillettes et la protrusion dorso mésenchymateuse (Mingfu and Jingjing, 2015 ; De Bono et al., 2018).
Certains gènes marquent spécifiquement une sous-population de cellules dans le champ cardiaque antérieur, comme *Tbx1, Fgf10* et *Fgf8* (Kelly et Buckingham, 2002 ; De Bono et al., 2018), tandis que d'autres sont exprimés dans le SHF postérieur, tels que *Aldh1a2, Tbx5* et *Hoxb1* (Ryckebusch et al., 2008).

Les évènements morphogénétiques des cellules du SHF sont finement régulés à la fois intrinsèquement et par les signaux moléculaires provenant des cellules de la crête neurale cardiaque (CNC) environnantes, de l'ectoderme pharyngé et de l'endoderme. Les facteurs de croissance des fibroblastes, la protéine BMP, ainsi que les voies de signalisation Hedgehog et Wnt sont parmi les molécules clés qui définissent la niche environnementale maintenant l'équilibre des cellules progénitrices du SHF et régulent leur déploiement tout au long de l'extension de l'OFT (Rochais et al., 2009).

ii. La voie efférente L'OFT

Comme vu précédemment, la mise en place du pôle artériel du cœur est un processus complexe et formera, après septation, la base myocardique des grandes artères sortant du cœur, l'aorte et le tronc pulmonaire. La formation du tube cardiaque linéaire, issu de la fusion du croissant cardiaque, marque le début de ce développement complexe. Ce tube cardiaque initial est constitué de cellules cardiaques primitives entourant une couche interne de cellules endothéliales. Il subit une série d'étapes morphogénétiques. L'incorporation progressive des cellules du SHF est essentielle pour l'allongement de l'OFT au pôle artériel du coeur (Kelly et al., 2001 ; Stefanovic et al., 2021). Les cellules SHF sont caractérisées par leur position médiale dans l'embryon, leur prolifération élevée et un délai de différenciation par rapport aux cellules du premier champ cardiaque. Cette régulation spatio-temporelle est orchestrée par des facteurs de transcription critiques tels que *Isl1, Foxh1, Tbx1, Pitx2* et *Mef2c* (Buckingham et al., 2005). Ces propriétés sont régulées à la fois intrinsèquement et par les cellules des CNC environnantes, ainsi que des cellules environnantes de l'ectoderme et de l'endoderme pharyngés, impliquant des voies de signalisation telles que FGF, BMP, Hh, et Wnt.

L'OFT est tapissé de cellules endocardiques qui dérivent également du mésoderme pharyngé. Au stade embryonnaire E8.0, les cellules de la crête neurale cardiaque, originaires du tube neural dorsal, interviennent précocement dans la limitation de la prolifération et la régulation du déploiement du champ cardiaque secondaire (Waldo et al., 2005a). Au cours de la formation de l'OFT, le pôle artériel du cœur est déplacé caudalement dans la région pharyngée lors de la morphogenèse des arcs pharyngés et de la formation d'artères bilatérales de l'arc aortique (Waldo et al., 2005b). À partir du stade embryonnaire E9.5, les cellules des CNC, qui proviennent du tube neural dorsal, commencent leur migration à travers les arcs pharyngés vers le pôle artériel du cœur. Ces cellules colonisent l'OFT, où elles jouent un rôle dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules endothéliales, un processus essentiel pour la formation des coussins cardiaques qui scinderont l'OFT en aorte et en tronc pulmonaire (Waldo et al., 2005a ; Waldo et al., 2005b). La différenciation et la prolifération des cellules cardiaques au niveau de l'OFT sont régulées par plusieurs voies de signalisation, notamment celles de FGF, des acides rétinoïques et de BMP, qui

coordonnent la progression des cellules SHF de leur état progéniteur à leur destinée myocardique (Rana et al., 2014).

Entre les stades E10.5 et E14.5, la septation de l'OFT s'accomplit pour former l'aorte ascendante et le tronc pulmonaire. Ce remodelage est accompagné de la prolifération des cellules mésenchymateuses et de l'extension de l'épicarde sur le myocarde (Eisenberg and Markwald, 1995 ; Person et al., 2005 ; Yamagishi, 2021). La transition des cellules endothéliales de la région proximale de l'OFT, passant d'un état épithélial à mésenchymateux, se fait sous l'influence de signaux dérivés du myocarde. Ce processus permet la formation des coussins OFT cardiaques entre les couches myocardique et endothéliale, ce qui, en convergeant en une structure en spirale, sépare le flux laminaire des ventricules gauche et droit embryonnaires. Entre E11.5 et E14.5 les coussins de cellules mésenchymateuses issues des cellules endothéliales peuplent la lumière du CAV, formant avec les cellules de la CNC en migration le mésenchyme des coussins de l'OFT (Eisenberg and Markwald, 1995 ; Person et al., 2005 ; Yamagishi 2021). Simultanément, l'épicarde, couche externe du cœur, s'étend sur le myocarde sous forme d'un feuillet de cellules migratrices provenant du proépicarde (Manner et al., 2001). La vascularisation coronaire se développe à partir de cellules endothéliales, épicardiques et de la CNC. (Mikawa et Fischman, 1992 ; Arima et al., 2012 ; Cano et al., 2016 ; Théveniau-Ruissy et al., 2016 ; Trimm and Red-Horse, 2022).

Les résultats du profilage transcriptionnel suggèrent une régulation spécifique des gènes et une diversité régionale dans l'OFT (Rana et al. 2014), ce qui pourrait avoir des implications importantes dans le développement cardiaque et la pathogenèse des malformations congénitales. En effet, l'étude de profilage de l'expression génique utilisant la technologie des microarrays a été réalisée, ciblant les domaines transcriptionnels des parois inférieures et supérieures de l'OFT (iOFT et sOFT, respectivement) à E10,5. Les résultats obtenus ont identifié des gènes spécifiquement enrichis dans les OFT ou l'iOFT. *Sema3c, Nrp2, Barx1, Dlx2*, sont enrichis dans l'iOFT, tandis que d'autres, comme *NPPA, MYL2, Tbx18 et Raldh2*, sont enrichis dans le sOFT (Rana et al., 2014). Comme nous l'avons vu, le développement de l'OFT est étroitement régulé par une série de voies de signalisation moléculaire, telles que la voie Fgf, les acides rétinoïques dérivés de la

vitamine A, et la voie de signalisation de la protéine BMP, jouant un rôle dans la prolifération, la migration et la différenciation des cellules cardiaques impliquées dans la formation de l'OFT. Des anomalies survenant au cours de ces processus complexes peuvent entraîner des malformations cardiaques congénitales sévères, telles que la tétralogie de Fallot (TOF), la transposition des gros vaisseaux (TGV), le tronc artériel commun (TAC), la sténose pulmonaire congénitale, la double sortie du ventricule droit (DORV), et les défauts du septum interventriculaire associés à l'OFT (Ahuja et al., 2007 ; Bruneau, 2013 ; Rochais et al., 2009). Ces conditions pathologiques soulignent l'importance critique de la régulation précise des événements développementaux qui sous-tendent la formation du pôle artériel du cœur (**Figure 5**).

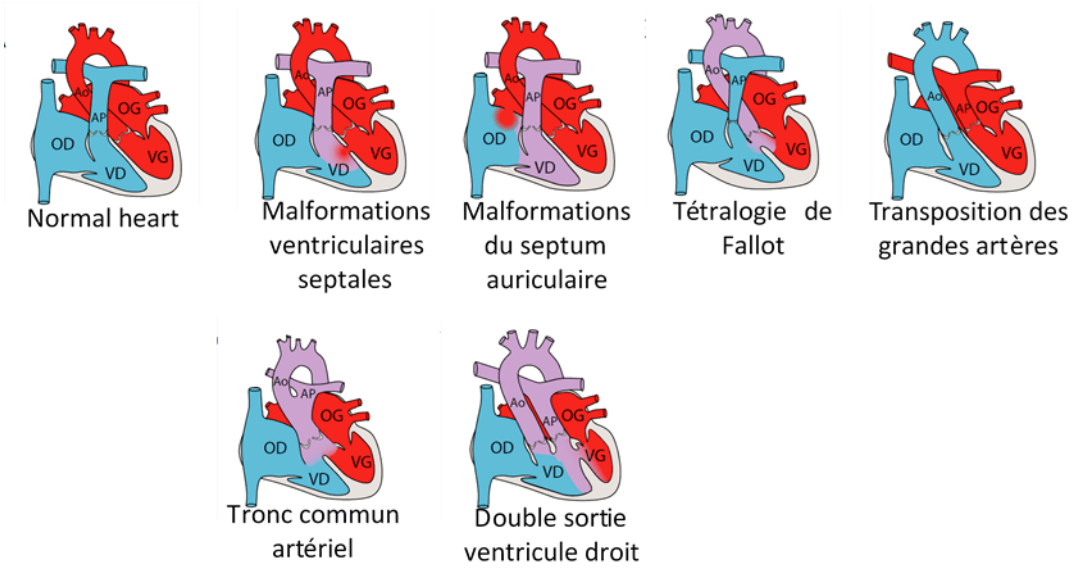


Figure 5 : Les différentes cardiopathies congénitales.

En bleu est représentée la circulation pulmonaire, en rouge la circulation systémique. La malformation ventriculaire septales est un trou dans le septum qui sépare les deux ventricules du cœur. Cela peut entraîner une surcharge pulmonaire et cardiaque, provoquant des symptômes comme la fatigue, une respiration rapide, et un retard de croissance chez les enfants. La malformation du septum auriculaire (ASD) est une ouverture dans le septum qui sépare les deux oreillettes du cœur ce qui provoquer un flux sanguin anormal. La Tétralogie de Fallot est une combinaison de quatre anomalies cardiaques : un défaut du septum interventriculaire (VSD), une sténose pulmonaire, une aorte à cheval et une hypertrophie du ventricule droit. La transposition des grandes artères (TGA), les deux principales artères qui sortent du cœur (l'aorte et l'artère pulmonaire) sont inversées entrainant une circulation de sang désoxygéné vers le corps

et de sang oxygéné vers les poumons. Le tronc commun artériel (TAC) est une malformation où une seule grande artère sort du cœur, au lieu des deux artères distinctes. Enfin, la double sortie du ventricule droit (DORV) est une malformation où les deux grandes artères (l'aorte et l'artère pulmonaire) sortent du ventricule droit.OD : oreillette droite ; OG : oreillette gauche ; VD : ventricule droit ; VG : ventricule gauche ; Ao : aorte ; AP : artère pulmonaire.

La composition anatomique de l'OFT, qui comprend le cône ou bulbus cordis et le tronc artériel, subit un rapide remodelage durant l'embryogenèse pour relier les ventricules embryonnaires au sac aortique. Au stade maximal de son extension, vers E11.5, l'OFT prend la forme d'un cylindre myocardique torsadé, recouvert de cellules endocardiques. Le processus de septation de l'OFT, pour donner naissance à la base de l'aorte et des artères pulmonaires, implique une coordination précise entre différents types cellulaires, notamment les cellules myocardiques, endocardiques et de la crête neurale (Anderson et al., 2019). La septation de l'OFT s'accompagne d'une rotation de la paroi OFT dans le sens inverse des aiguilles d'une montre, ce qui entraîne l'alignement de l'aorte avec le ventricule gauche et du tronc pulmonaire avec le ventricule droit (Marguerie et al., 2006). Ce processus de cloisonnement est complété par la convergence de l'OFT, des septa auriculo-ventriculaires et ventriculaires. La paroi myocardique distale OFT d'origine contribue en partie au myocarde sous-pulmonaire ventriculaire droit et subit en partie une mort cellulaire programmée induite par l'hypoxie lors de l'alignement ventriculo-artériel. Au cours du processus de remodelage, des valves semi-lunaires se forment à la jonction angulaire des régions proximale et distale de l'OFT à partir des coussins OFT d'origine et de deux coussins intercalés (Anderson et al., 2019). La mise en place des artères coronaires s'effectue en région distale de l'OFT à partir du stade E12.5. Les ostia se forment à la base de l'aorte (Théveniau-ruissy et al., 2016) et le plexus coronaire dérivé de l'épicarde envahit sélectivement la base de l'aorte au-dessus des deux feuillets valvulaires faisant face au tronc pulmonaire, formant des ostia reliant le système coronaire à l'aorte ascendante.

Différentes études ont mis en évidence des différences transcriptionnelles entre les régions supérieure et inférieure de l'OFT embryonnaire, qui préfigurent respectivement le myocarde sous-aortique et sous-pulmonaire (Buckingham et al., 2005 ; Marguerie et al.,

2006 ; Rana et al., 2016 ; De Bono et al., 2018 ; Rammah et al., 2022). Le transgène *y96-Myf5-nlacZ-16 Sema3c* enhancer trap (*Sema3c-Tg*) est exprimé initialement dans la paroi iOFT, puis dans la base du tronc pulmonaire, tandis que le transgène *A17-Myf5-nlacZ-T55 Hes1* enhancer trap (*Hes1-Tg*) est exprimé dans la paroi sOFT, puis ultérieurement dans le myocarde à la base de l'aorte ascendante (Théveniau-Ruissy et al., 2008 ; Rochais et al., 2009). Cela suggère que des lignées cellulaires progénitrices distinctes contribuent aux régions inférieures et supérieures de l'OFT. Plus précisément, les cellules du SHF exprimant le facteur de transcription *Tbx1* contribuent aux parois inférieure et latérale, *TBX1* est nécessaire à la morphogenèse correcte du myocarde sous-pulmonaire, agissant par le contrôle de l'ajout de cellules exprimant *Hoxb1* du SHF postérieur à l'iOFT (Théveniau-Ruissy et al., 2008 ; Bertrand et al., 2011, Rana et al., 2014 ; Stefanovic et al., 2020). Par ailleurs, le répresseur transcriptionnel et principale cible de la voie de signalisation NOTCH, *Hes1* (hairy et enhancer of split-1), est exprimé dans le futur myocarde sous-aortique, et la perte de fonction de *Hes1* entraîne des anomalies du pôle artériel et du septum ventriculaire (Rochais et al., 2009 ; Rammah et al., 2022).

Les perturbations génétiques ou environnementales de l'allongement et du remodelage de l'OFT entraînent des cardiopathies congénitales conotruncales, représentant 30 % de toutes les cardiopathies congénitales (environ 0,3 % des naissances vivantes). Des études anatomiques, expérimentales et génétiques approfondies de la morphogenèse de l'OFT ont révélé l'implication de plusieurs types de cellules et de voies de signalisation dans le développement de l'OFT, suggérant que la complexité du développement sous-tend l'incidence élevée des anomalies de l'OFT chez l'Homme (Stefanovic et al., 2021).

iii. Les crêtes neurales cardiaques (CNC)

Les cellules de la CNC ont pour origine les bourrelets neuraux et migrent à travers les arcs pharyngés 3, 4 et 6 pour coloniser l'OFT et induire son cloisonnement en aorte et tronc pulmonaire (**Figure 6**). Ce sont des cellules progénitrices embryonnaires précoces caractérisées par leurs capacités migratoires impressionnantes et leur multipotence. Elles

ont été décrites pour la première fois dans l'embryon de poulet en 1868 par Wilhelm Hes comme étant formées dans l'ectoderme mais contribuant à la glie sensorielle, et donnent naissance à une variété étendue de dérivés. Des études de lignées cellulaires ont mis en évidence leur contribution au développement des artères de l'arc aortique (tunique des muscles lisses), des tissus glandulaires du cou (thymus, thyroïde et glandes parathyroïdes) et de l'innervation sympathique et parasympathique du cœur (Hildreth et al., 2008 ; Hutson et Kirby, 2007).

Chez le poulet, l'ablation des CNC cardiaques entraîne un défaut d'inflexion du tube cardiaque, suggérant une interaction précoce entre ces cellules et les progéniteurs du deuxième champ cardiaque (Waldo et al., 2005a ; Waldo et al., 2005b). Les molécules d'adhésion, telles que les intégrines, régulent l'interaction des CNC avec la matrice extracellulaire, tandis que les cadhérines et les jonctions gaps formés par les connexines favorisent les interactions entre les CNC au cours de leur migration. Les sémaphorines interviennent également dans la formation de ces contacts intercellulaires.

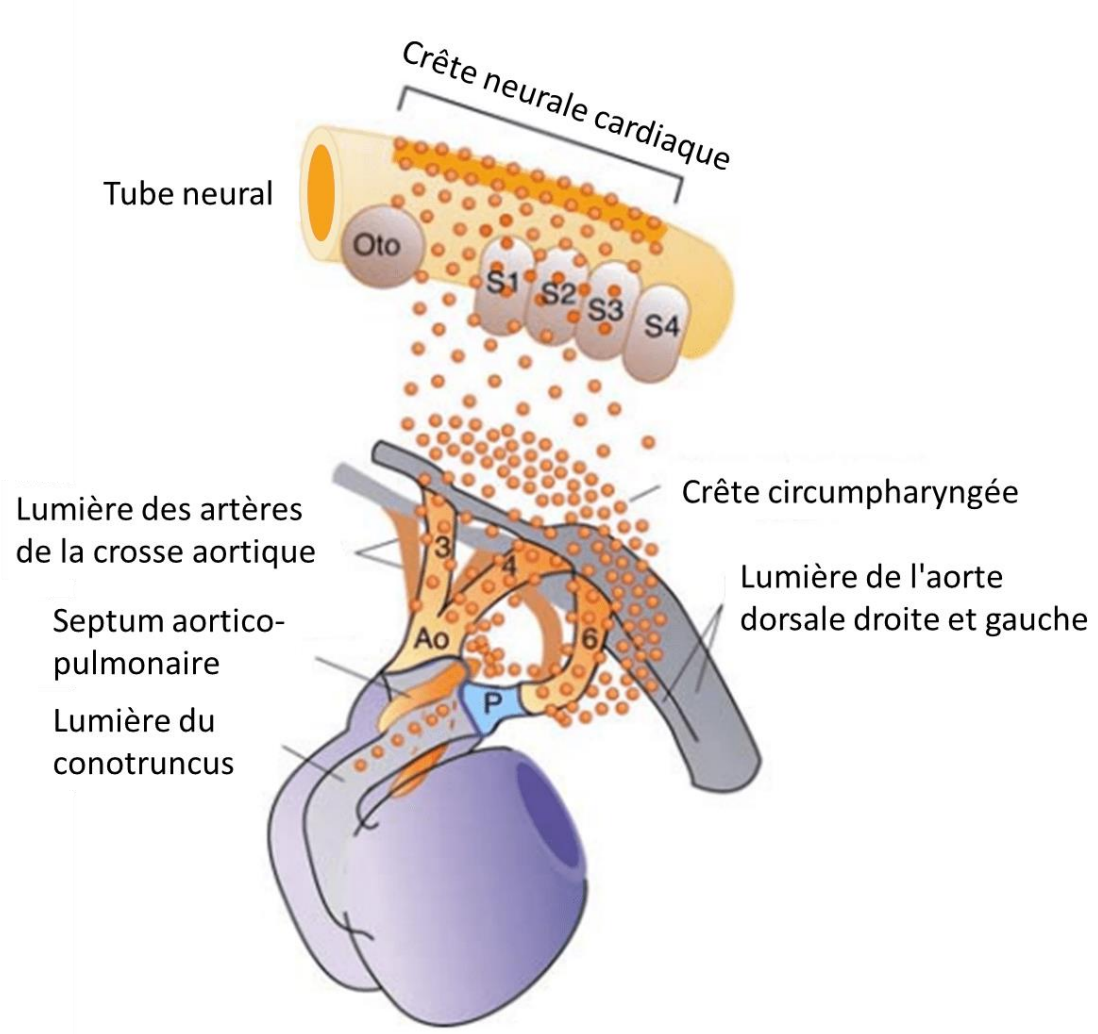


Figure 6 : Migration des crêtes neurale cardiaque.

La migration des CNC vers la crête circumpharyngée, les arcs pharyngés caudaux (troisième, quatrième et sixième) et l'OFT avant le remodelage asymétrique des artères de la crosse aortique. Ao, base de l'aorte ; P, tronc pulmonaire ; S, somite ; Oto, otocyste (Kirby, Cardiac development. New York: Oxford University Press; 2007)

Pendant la phase de développement de l'OFT, une sous-population de la CNC se déplace et envahit les coussins endocardiques de l'OFT commun. L'allongement de l'OFT permet d'obtenir une boucle correcte, une rotation complète et un alignement adéquat lors de la séparation de l'OFT. Les lignées CNC et SHF jouent toutes deux un rôle essentiel dans ce processus (Yamagishi, 2021). Les CNC contribuent aux coussins mésenchymateux déjà présents dans l'OFT (Mingfu and Jingjing 2015) puis s'organisent pour effectuer la septation en spirale de l'OFT. Ce processus de spirale entraîne un réalignement des vaisseaux : l'aorte se repositionne postéro-latéralement, tandis que l'artère pulmonaire se déplace antéro-médialement. Le septum de l'OFT fusionne ensuite avec les crêtes

bulbaires. Parallèlement, la prolifération du coussin endocardique inférieur est essentielle pour compléter la fermeture du septum interventriculaire. Si ce processus ne se déroule pas correctement, il en résulte une communication interventriculaire ou VSD qui est une malformation cardiaque où il y a un mélange de sang entre les deux ventricules.

C. Les gènes et voies de signalisation impliqués dans le développement du pole artériel

La prolifération et le déploiement des cellules progénitrices du SHF sont des processus complexes qui impliquent une grande variété de gènes et voies de signalisation. La perturbation des ces processus conduit à des formes courantes de pathologies cardiaques congénitales (congenital heart defect, CHD).

i. Les gènes impliqués dans le développement du pôle artériel

ISL1, un facteur de transcription appartenant à la famille des gènes LIM-homeobox. Il joue un rôle clé dans le développement des systèmes cardiaque, pancréatique et neuronal. Les cellules progénitrices du SHF expriment *Isl1*. L'expression d'Isl1 et le traçage des cellules du SHF montrent qu'*Isl1* est un marqueur distinctif de ces progéniteurs indifférenciés, responsables des segments cardiaques manquants chez les mutants d'*Isl1*. La fonction d'Isl1 est cruciale pour que ces progéniteurs contribuent au développement du cœur. Chez les souris dépourvues d'*Isl1*, le cœur est entièrement privé de l'OFT, du ventricule droit, ainsi que d'une grande partie des oreillettes (**Figure 7**). Chez les mutants d'*Isl1*, le nombre de progéniteurs exprimant *Isl1* diminue progressivement, et les niveaux des facteurs de croissance FGF et BMP sont également réduits (Cai et al., 2003 ; Rochais

et al., 2009). Il est intéressant de noter que dans l'aSHF la signalisation Wnt/β-caténine inhibe directement la transcription de *Isl1* et *Fgf10*. Par ailleurs, *GATA4* et *FOXC2* régulent également l'expression d'*Isl1*. *Isl1* active ensuite, l'activité enhancer menant à l'expression de *Mef2c* et *Fgf10* dans les cellules progénitrices du SHF (Dodou et al., 2004 ; Watanabe et al., 2012).

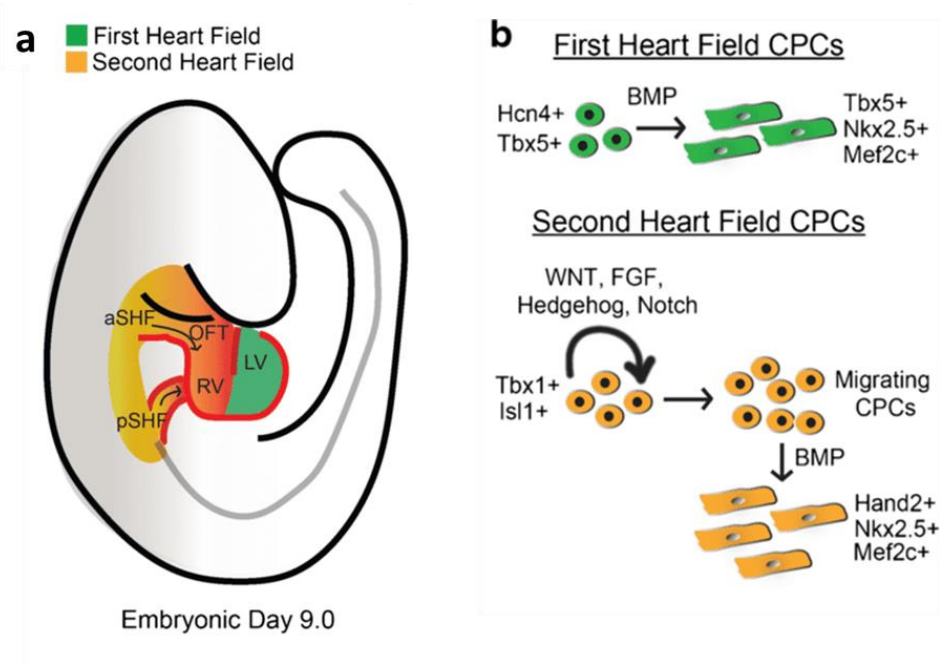


Figure 7 : Régulation des cellules progénitrices cardiaques dans les champs cardiaques antérieur et postérieur.

A) L'embryon de souris à E9 est représenté, mettant en évidence le deuxième champ cardiaque antérieur (aSHF) et le deuxième champ cardiaque postérieur (pSHF). Ces champs sont associés à l'OFT, au ventricule droit (VR) et gauche (VG), ainsi qu'au maintien des progéniteurs cardiaques. Les cellules progénitrices migrantes du deuxième champ continuent à contribuer au développement du cœur en développement. B) les voies de signalisation et les facteurs de transcription qui régulent la prolifération, le maintien et la différenciation des cellules progénitrices cardiaques dans les deux champs cardiaques. (Miyamoto et al., 2021)

Tbx1 est un gène critique du développement cardiaque. Il joue un rôle essentiel dans les cellules du SHF pour le développement des régions myocardiques spécifiques à la base du tronc pulmonaire (Théveniau-Ruissy et al., 2008). *Tbx1* est le gène majeur responsable du syndrome de DiGeorge (del22q11.2) (Kelly et al., 2004 ; Alfano et al., 2019). Cette pathologie affecte l'OFT et un modèle de souris dont le gène *Tbx1* est absent a été généré

(Jerome and Papaionaou, 2001). Les souris privées de *Tbx1* montrent des défauts sévères dans le développement des dérivés pharyngés, y compris des anomalies au niveau des cellules progénitrices cardiaques du SHF, qui sont essentielles pour la formation du pôle artériel du cœur. Chez les embryons mutants pour *Tbx1*, l'OFT est court et étroit, entraînant la formation d'un tronc artériel commun (Théveniau-Ruissy et al., 2008). *Tbx1* régule positivement la prolifération des cellules dans le SHF, probablement en influençant transcriptionnellement les gènes *Fgf10*, *Fgf8* et *Fgfr1*. *Tbx1* lui-même est régulé positivement par la signalisation Sonic Hedgehog (Shh) et négativement par la signalisation de l'acide rétinoïque, ce qui souligne son rôle central dans l'intégration de différentes voies de signalisation pendant le développement du SHF (Rochais et al., 2009). Chez le mutant *Tbx1*, la prolifération des cellules progénitrices du SHF est affectée et les cellules du SHF se différencient précocement (Chen et al., 2009). Il a été démontré que *Tbx1* retarde la différenciation en régulant négativement *Mef2c* et *Srf* (Chen et al., 2009 ; Pane et al., 2012). Dans la partie pSHF, les signaux provenant de Wnt, BMP, *Tbx5* et Hh sont cruciaux pour le déploiement des progéniteurs et le développement du septum auriculaire (Anderson et al., 2002 ; Soufan et al., 2003). La région du pSHF se développe à partir du SHF avec une co-expression transitoire de *TBX1 et TBX5*, suivie par une régulation négative du programme du SHF antérieur (De bono et al., 2018). Ainsi, il s'établit alors une frontière transcriptionnelle dans la paroi péricardique dorsale (Steimle et al., 2018 ; Rowton et al., 2022). La région du pSHF (*Tbx5* positive) contribue au développement de la protrusion dorso-mésenchymateuse qui permet la septation auriculo-ventriculaire (de Bono et al., 2018). Le transgène y96-Myf5-nlacZ-16 Sema3c enhancer trap est initialement exprimé dans l'iOFT puis à la base du tronc pulmonaire. Cela suggère que des lignées cellulaires progénitrices distinctes contribuent aux régions inférieures et supérieures de l'OFT (**Figure 8**). Les cellules du SHF exprimant Sema3c contribuent à cette régulation régionale, influençant ainsi la formation et la différenciation des structures cardiaques spécifiques (Théveniau-Ruissy et al., 2008 ; Rochais et al., 2009).

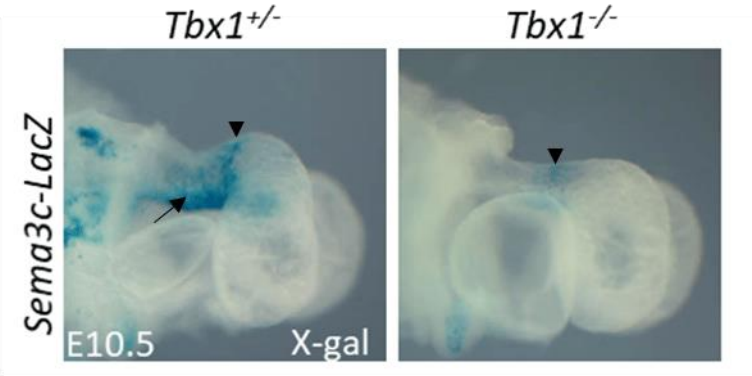


Figure 8 : Expression du transgène *Sema3c-LacZ* dans les cœurs mutants *Tbx1*.

Vues ventrale droite d'un cœur de E10,5 montrant l'expression la -galactosidase dans la paroi inférieure de l'OFT (flèche). Noter un petit nombre de cellules positives dans la paroi OFT supérieure (tête de flèche). La deuxième vue montre un nombre réduit de cellules positives *Sema3c-LacZ* uniformément réparties dans la paroi de l'OFT supérieur (tête de flèche) chez le mutant null *Tbx1* (Théveniau-Ruissy et al., 2008).

L'expression des gènes Hox, régulée par l'AR, est essentielle pour la régionalisation antéro-postérieure et gauche-droite du SHF (Bertrand et al., 2011). La signalisation de l'AR est cruciale pour le renouvellement des cellules progénitrices du SHF et pour leur migration vers le cœur en développement (Li et al., 2010). Cette régulation permet la migration de sous-groupes distincts de cellules progénitrices du SHF vers des régions spécifiques du cœur, comme les cellules progénitrices postérieures qui contribuent au développement de l'oreillette dorsale gauche et du canal auriculo-ventriculaire supérieur. La signalisation de l'acide rétinoïque est cruciale pour l'activation précoce de l'expression des gènes Hox pendant le développement du cœur. Chez les embryons dont la synthèse de l'AR est perturbée (mutants *Raldh2*$^{-/-}$), des profils d'expression anormaux de 3′ gènes Hox apparaissent, indiquant que l'AR est essentiel pour établir la structuration antéro-postérieure du SHF. Plus précisément, l'expression régionalisée de *Hoxb1* et *Hoxa1* dans le mésoderme splanchnique est nécessaire pour définir des sous-domaines de progéniteurs distincts au sein du SHF. Les études de traçage génétique révèlent que les lignées *Hoxb1*, *Hoxa1* et *Hoxa3* contribuent aux pôles artériels et veineux du cœur. Il est intéressant de noter que les descendants de *Hoxb1* se localisent dans l'OFT et les oreillettes proximales, alors que les descendants de *Hoxa1* et *Hoxa3* sont limités à l'OFT distale et à des régions spécifiques des oreillettes. Cela suggère que la ségrégation des

progéniteurs cardiaques a lieu avant leur incorporation dans les pôles cardiaques (Bertrand et al., 2011).

Hoxb1 joue un rôle régulateur négatif dans la différenciation des cellules du SHF postérieur. Une expression spatiale inadéquate de *Hoxb1* dans le SHF antérieur entraîne une hypoplasie du ventricule droit. L'activation de *Hoxb1* dans les cellules souches embryonnaires bloque la différenciation cardiaque, tandis que les embryons de souris déficients en *Hoxb1* montrent une différenciation cardiaque prématurée. De plus, une différenciation ectopique dans le SHF postérieur des embryons privés à la fois de *Hoxb1* et de son paralogue *Hoxa1* cause des malformations septales auriculo-ventriculaires (Stefanovic et al., 2020).

ii. Voies de signalisation impliquées dans le développement du pôle artériel

La voie de signalisation Fgf

Les facteurs de croissance fibroblastiques, composés d'une famille de 22 protéines pléiotropes identifiées chez l'Homme et la souris, jouent des rôles cruciaux dans le cœur, allant du développement à l'homéostasie et à la maladie. Les études qui ont été réalisées chez la souris démontrent que dès les premiers stades du développement cardiaque, la signalisation FGF est essentielle à la morphogenèse normale, influençant de manière significative les cellules du SHF et de la CNC, qui sont déterminantes pour la formation de l'OFT (Waldo et al., 2001 ; Kelly et al., 2014 ; Hubert et al., 2018).

Les FGF 2, 3, 4, 8, 10, 16 et 20 facilitent la communication entre et au sein des cellules souches progénitrices cardiaques du SHF, modulant ainsi la leur prolifération ainsi que, la spécification myocardique et, finalement, le développement de l'OFT. Ainsi, Le FGF2 est

fortement exprimé dans le cœur des souris et dans les souris transgéniques sur-exprimant FGF2, on observe développent une hypertrophie cardiaque. Cette hypertrophie est atténuée en présence d'un inhibiteur d'ERK, mais non par un inhibiteur de la voie p38 (House et al., 2010). En ce qui concerne *Fgf8*, la perte précoce du gène dans le mésoderme cardiaque conduit à des anomalies de survie et de prolifération dans le SHF, ainsi qu'à un échec de l'allongement du tube cardiaque. Les cœurs des embryons mutants qui survivent montrent une hypoplasie du ventricule droit et de l'OFT, accompagnée de graves défauts d'alignement. De plus, l'élimination de *Fgf8* dans le mésoderme pharyngé à des stades plus avancés entraîne également un échec de l'alignement de l'OFT (Rochais et al., 2009). FGF10 est exprimé dans le SHF ainsi que dans les cœurs des souris nouveau-nés qui présentent une forte capacité de régénération jusqu'au 7e jour postnatal (Hubert et al., 2018). *Fgf10* est exprimé dans le mésoderme pharyngé entre le jour embryonnaire E8.5 et E10.5, et est donc reconnu comme un marqueur exclusif de la SHF (**Figure 9**) (Kelly et al., 2001). Les embryons dépourvus de Fgf10 ne présentent pas de défauts d'alignement ou de septation de l'OFT malgré une morphogenèse ventriculaire anormale et mauvais positionnement du cœur dans la cavité thoracique (Rochais et al., 2009).

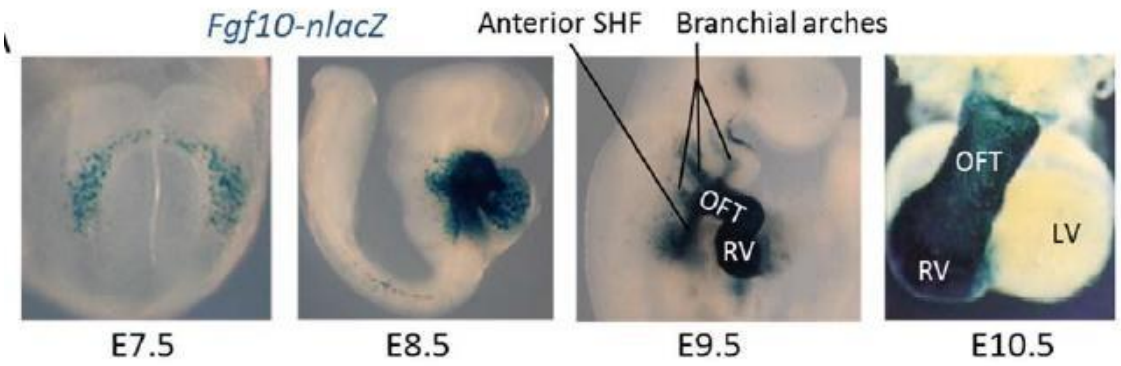


Figure 9 : Sites d'expression du transgène *Mlc1v-nLacZ-24* (*Fgf10* enhancer trap) à différents stades de développement.

A E7.5, vues ventrales, les cellules qui expriment le transgène sont observées en position médiane par rapport au croissant cardiaque. A E8.5 et E9.5 la vue latérale droite, l'activité β-Gal est observée dans le ventricule droit (RV) et le myocarde de l'OFT contiguës à des cellules positives dans la paroi péricardique dorsale et dans la région pharyngée. À E10,5, une limite d'expression du transgène est observée à l'extrémité distale de l'OFT (Kelly et al.,2001).

Pendant les phases précoces du développement cardiaque, les membres de la famille FGF sont exprimés différemment selon les régions anatomiques. Par exemple, FGF8 est essentiel dans le second champ cardiaque pour la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices cardiaques, jouant un rôle clé dans l'allongement de l'OFT et dans la formation des ventricules (Rochais et al., 2009; Kelly et al., 2001). FGF10 est également impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules du SHF, contribuant à la formation des ventricules et du pôle artériel (Watanabe et al., 2010). FGF1 et FGF2, quant à eux, sont cruciaux pour la survie des cardiomyocytes et pour l'angiogenèse myocardique au sein des régions déjà différenciées du cœur en développement. La signalisation via les récepteurs FGFR1 et FGFR2 est également indispensable pour la migration et la prolifération des cellules cardiaques, influençant ainsi la morphogenèse cardiaque globale (Watanabe et al., 2010).

FGF8 et *FGF10* sont régulés par les facteurs de transcription Isl1 (Watanabe et al., 2012; Cai et al., 2003) et *Tbx1* (Watanabe et al., 2012), tandis que FGF10 est également sous le contrôle de la signalisation WNT (**Figure 10**) (Cohen et al., 2007). Les souris présentant des mutations simultanées de *FGF8* et *FGF10* montrent une hypoplasie du tractus de sortie et du ventricule droit (Marguerie et al., 2006). De plus, les souris mutantes pour *FGF3* et *FGF10* présentent fréquemment des anomalies du septum et de l'OFT (Urness et al., 2011). La suppression des récepteurs du FGF provoque également des malformations cardiaques telles qu'une hypoplasie de l'OFT et du RV, un désalignement de l'OFT, des malformations septales atrioventriculaires et un ventricule droit à double sortie (Marguerie et al., 2006; Park et al., 2008). Cependant, en raison de la redondance fonctionnelle, la mutation de *FGF10* affecte principalement la formation des vaisseaux pulmonaires, le positionnement du cœur, et la réentrée des cardiomyocytes dans le cycle cellulaire (Marguerie et al., 2006), tandis que la délétion de FGF8 dans les régions antérieures du cœur révèle son rôle crucial dans la formation de l'OFT (Ilagan et al., 2006). Les mutations humaines de *FGFR1*, *FGF8* et *FGF10* sont associées à des malformations cardiaques liées au SHF, telles que des anomalies septales auriculaires et ventriculaires, une dilatation du ventricule droit et des anomalies cardiaques (Zhou et al., 2020).

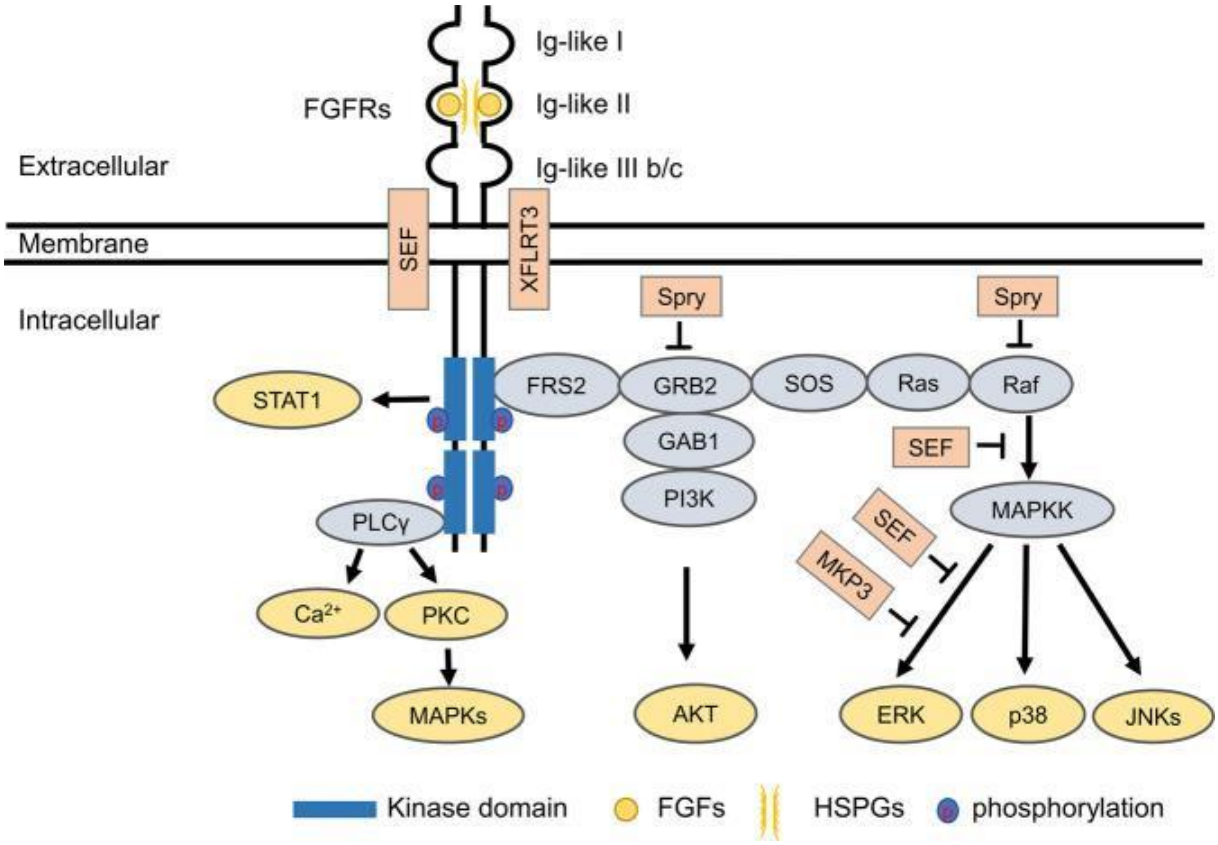


Figure 10 : Voies classiques FGF/FGFR.

Lorsque les facteurs de croissance appropriés se lient aux récepteurs FGF, cela induit des changements de conformation des FGFR, entraînant leur dimérisation et leur activation. Les FGFR activés phosphorylent FRS2α, qui se lie ensuite à l'adaptateur Grb2 via son domaine SH2. Grb2, à son tour, se connecte à SOS, GAB1 et Cbl par l'intermédiaire de son domaine SH3, ce qui active les cascades Ras/Raf/MAPK, y compris ERK MAPK, p38 MAPK et JNK MAPK. Les FGFR activés stimulent également la phosphatidylinositol (PI)-3 kinase et STAT, et recrutent et phosphorylent PLCγ. Parmi les protéines associées à la signalisation FGF, SEF et XFLRT3, qui sont des protéines transmembranaires, peuvent interagir directement avec les FGFR. SEF agit comme un régulateur négatif en modulant la phosphorylation dans la cascade MAPK ERK. XFLRT3 forme un complexe avec les récepteurs FGF et amplifie la signalisation FGF/FGFR. Spry intervient au niveau de Grb2 et/ou de Raf pour modérer la signalisation FGF/FGFR. MKP3 exerce une régulation négative en déphosphorylant l'ERK activée. FRS2α (FGFR Substrate 2α), GAB1 (GRB2 Associated Binding Protein 1), GRB2 (Growth Factor Receptor-Bound 2), PKC (Protein Kinase C), SOS (Son of Sevenless) (Xie et al., 2020).

La voie de signalisation SHH

Sonic Hedgehog est une protéine sécrétée, modifiée par le cholestérol, qui interagit avec le récepteur transmembranaire Patched (Ptch). Cette interaction provoque l'internalisation des complexes Shh-Ptch, libérant ainsi la protéine Smoothened (Smo) qui migre vers le cil cellulaire. Smo active les protéines GLI, qui se déplacent alors vers le noyau pour induire la transcription de gènes cibles (Rohatgi et al., 2007). Il a été démontré que la signalisation SHH joue un rôle crucial dans le développement du SHF, le développement de l'OFT et la septation des oreillettes (Goddeeris et al., 2007 ; Hoffmann et al 2009 ; Dyer and Kirby, 2009). La SHH, sécrétée par l'endoderme pharyngé, est captée par les cellules du SHF, maintenant ainsi leur prolifération *GATA4* joue un rôle essentiel, dans les progéniteurs cardiaques pour la signalisation SHH (**Figure 11**). Il est requis pour prolifération et l'alignement de l'OFT, et des mutations de Gata4 chez la souris provoquent un DORV (Liu et al., 2019). À l'inverse, les signaux *BMP2* et *BMP4* dans le myocarde de l'OFT répriment la prolifération des cellules réceptrices de SHH, leur surexpression entraînant une différenciation prématurée des cellules SHF et leur inactivation entraînant une létalité embryonnaire. SHH régule également le développement des cellules progénitrices *Six2*$^{+}$, qui contribuent au ventricule droit, à la voie d'entrée, au tronc pulmonaire et au canal artériel. L'ablation des cellules *Six2*$^{+}$ chez la souris conduit à des CHDs sévères telles que le tronc artériel commun. De plus, SHH est nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale cardiaque vers le coussin OFT, les mutations de SHH entraînant la mort et la mauvaise localisation de ces cellules. Bien que le rôle de SHH dans les CHDs humaines n'ait pas été systématiquement examiné, la découverte de régulateurs de la signalisation SHH parmi les mutations causant des CHDs s dans un crible de mutagenèse murine à grande échelle suggère que cette voie est probablement importante pour les CHDs humaines.

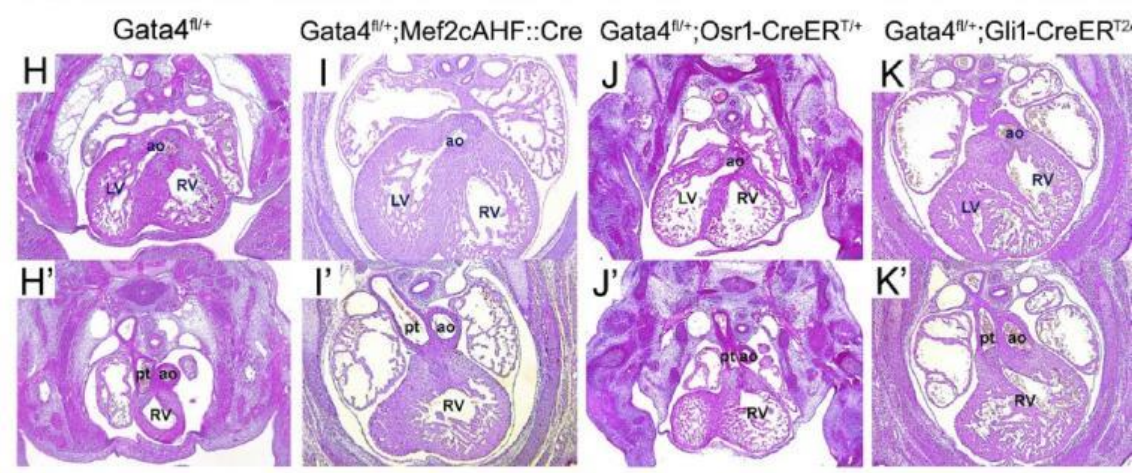


Figure 11 : Gata4 est nécessaire au développement de l'OFT dans les cellules réceptrices de Hh.

(H-K) montrent que l'ouverture de l'AO est connectée au ventricule droit dans l'haplo-insuffisance *Gata4*, alors que dans les embryons contrôles l'AO s'ouvre au ventricule gauche. LV, ventricule gauche ; RV, ventricule droit ; ao, artère aorte ; pt, tronc pulmonaire (Liu et al., 2019).

Le knock-out conditionnel supprimant Shh des cellules exprimant Nxk2.5 a conduit à la formation d'une seule voie d'éjection, et la mort des cellules dérivées de la CNC dans les arcs pharyngés (Goddeeris et al., 2007). Des travaux récents ont montré que le SHH est l'un des facteurs maintenant la prolifération des progéniteurs du SHF (Dyer et Kirby, 2009). Cette prolifération est essentielle pour générer un myocarde et un muscle lisse adéquat pour former le pôle artériel. Il est intéressant de noter que la période durant laquelle la prolifération est essentielle est assez étroite : chez le poussin, le pic de prolifération dans le SHF se produit entre HH15 et 17. Au moment où le myocarde a été ajouté à la voie d'écoulement, la prolifération a diminué dans cette région (Dyer et Kirby, 2009). Un autre point critique est que l'atrésie pulmonaire est le défaut prédominant qui se produit en l'absence de signalisation Shh, et ce défaut se produit malgré la présence d'un septum de sortie de la crête neurale. Parce que Shh a joué des rôles plus précoces dans l'asymétrie droite-gauche, il n'est pas surprenant que Shh semble affecter un côté du champ cardiaque secondaire (le côté droit) plus que l'autre.

La voie de signalisation Wnt/β-caténine

La signalisation Wnt est nécessaire dans le développement du second champ cardiaque (Klaus et al., 2007). Initialement, on pensait que les Wnts étaient principalement dérivés de sources ectodermiques ou endodermiques (Tzahor et al., 2001 ; Kemp et al., 2005). Cependant, des recherches récentes ont montré que les Wnts sont plutôt enrichis dans les progéniteurs du premier champ cardiaque, tandis que l'activité Wnt est particulièrement élevée dans les progéniteurs du SHF (Andersen et al., 2018). La voie Wnt/β-caténine joue un rôle crucial dans divers aspects du développement cardiaque, y compris la régulation de la prolifération cellulaire dans le SHF (Miyamoto et al., 2021 ; Miyamoto et al., 2023).

La voie WNT canonique est définie par une signalisation médiée par l'effecteur transcriptionnel β-caténine et joue un rôle biphasique dans le développement cardiaque (Naito et al., 2006). Dans un premier temps, la WNT est indispensable à la formation du mésoderme durant la gastrulation (Arnold et al., 2007). Ensuite, elle favorise la prolifération cellulaire tout en inhibant la différenciation en cardiomyocytes (Marvin et al., 2001). Par conséquent, les cellules du premier champ cardiaque ne reçoivent pas de signaux WNT lors de leur différenciation (Jain et al., 2015), tandis que les cellules du SHF sont maintenues en tant que réserves de progéniteurs et empêchées de se différencier prématurément grâce à la signalisation WNT (Qyang et al., 2007 ; Andersen et al., 2018). Une diminution de la signalisation WNT pourrait ainsi entraîner une hypoplasie du ventricule droit et de l'OFT, tandis qu'une activation excessive pourrait provoquer des malformations du tube cardiaque en induisant une différenciation inappropriée des progéniteurs du SHF (Klaus et al., 2007) (**Figure 12**). À mesure que les progéniteurs cardiaques du SHF migrent vers le cœur, la signalisation WNT diminue, permettant aux cellules de se différencier en cardiomyocytes (Jain et al., 2015). De plus, les WNT non canoniques, telles que Wnt5a et Wnt11, qui signalent indépendamment de la β-caténine, sont exprimées dans l'OFT. Les mutations des WNT non canoniques affectent les progéniteurs cardiaques de l'OFT, conduisant à une hypoplasie de l'OFT en favorisant l'activation des voies WNT canoniques (Cohen et al., 2012 ; Bisson et al., 2015). Les mutations dans les voies WNT sont probablement létales ; cependant, les variantes

affectant la voie WNT canonique ont été associées à la tétralogie de Fallot et à l'insuffisance de la valve mitrale (Zhu et al., 2019).

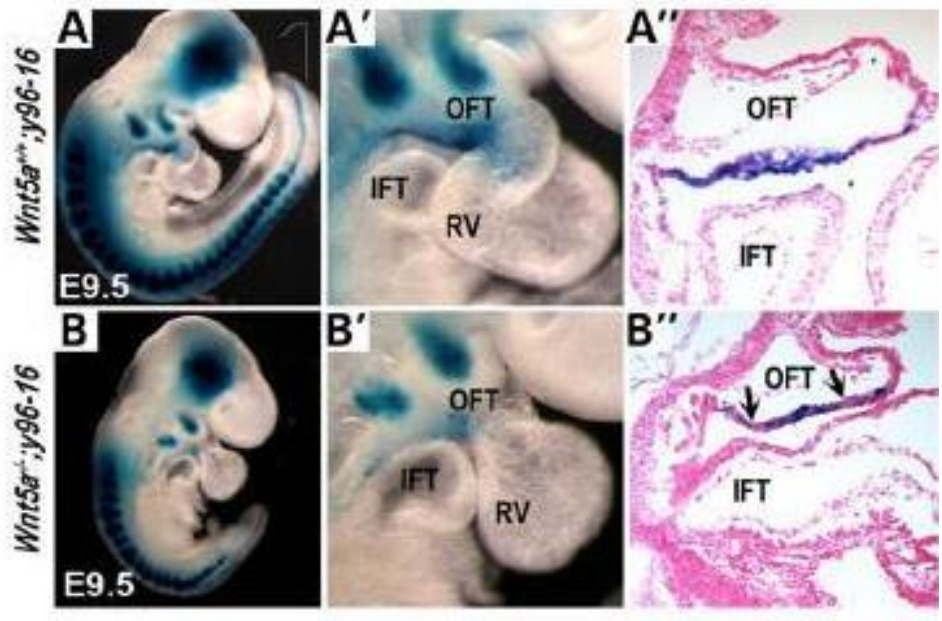


Figure 12 : Réduction de myocarde sous-pulmonaire chez les mutants *Wnt5a*$^{-/-}$.

Les mutants *Wnt5a*$^{-/-}$ présentent un myocarde OFT inférieur réduit et un myocarde OFT supérieur étendu de manière ectopique. La coloration X-gal et les coupes histologiques des embryons E9.5 (stade somite 22-24) *Wnt5a*$^{+/+}$;y96-16 montrent que les cellules exprimant y96-16 sont normalement présentes sous forme de couche contiguë dans la paroi myocardique OFT inférieure (A–A″). En revanche, chez les mutants *Wnt5a*$^{-/-}$, les cellules exprimant y96-16 sont significativement réduites en nombre (B–B″) et se présentent sous forme de petites zones entremêlées de cellules LacZ négatives (flèches noires, B″). OFT, voie de sortie ; IFT, voie d'entrée ; RV, ventricule droit ; VG, ventricule gauche ; Ao, aorte ; PA, artère pulmonaire ; CAT, tronc artériel commun (Sinha et al., 2015)

Des gènes candidats des cardiopathies impliqués dans la voie Wnt ont été identifiés chez des patients atteints de valve aortique bicuspide (Rim et al., 2022). De plus, un enrichissement pour les variants *de novo* des gènes de la voie Wnt a été observé chez des patients présentant des CHDs. Dans la souris, la délétion d'Apc (Adenomatous Polyposis Coli) un régulateur négatif de la signalisation Wnt canonique, entraîne l'activation de la signalisation canonique Wnt/β-caténine dans les CM et conduit à une hyperplasie ventriculaire sans effets sur la survie fœtale ou la différenciation des CM (Ye et al., 2015). D'autres régulateurs contextuels de la voie Wnt, comme *Bcl9* et *Pygo*, sont associés à des anomalies cardiaques, telles que le défaut de canal auriculo-ventriculaire (AVSD) chez la

souris et la TOF chez l'Homme. La signalisation Wnt canonique est régulée par les interactions entre *Dkk1/2*, et les souris doublement knock-out pour *Dkk1* et *Dkk2* présentent une hypoplasie myocardique et épicardique, ainsi qu'une communication interventriculaire (VSD) à des stades de développement ultérieurs (Williams et al., 2019).

La voie de signalisation acide rétinoïque (AR)

Des études menées sur les récepteurs de l'AR (*RARα1, RARβ, RXRα*) et sur les embryons mutants Raldh2 ont démontré le rôle essentiel de la signalisation de l'AR dans le développement de l'OFT (Li et al., 2010). Les résultats obtenus à partir de mutants RAR suggèrent que les domaines proximal et distal de l'OFT sont déjà pré-structurés au sein du mésoderme splanchnique, une observation qui correspond à l'expression différenciée des gènes Hox (*Hoxb1, Hoxa1, Hoxa3*) dans le second champ cardiaque et à leurs contributions spécifiques à l'OFT. En conséquence, on peut imaginer que le SHF est organisé selon un gradient antéro-postérieur : les cellules qui forment le ventricule droit et la paroi supérieure de l'OFT (négatives pour Hox), celles qui contribuent à la paroi inférieure de l'OFT proximal (positives pour *Hoxb1*), et celles participant à la paroi inférieure de l'OFT distal (positives pour *Hoxb1* et *Hoxa1*). Les cellules situées le plus en arrière contribuent au myocarde auriculaire.

A l'aide des embryons transgéniques *RARE-LacZ* (Élément de Réponse à l'Acide Rétinoïque) il a été mis en évidence une contribution nette des cellules qui expriment l'AR au SHF et au myocarde de l'iOFT qui formera le futur myocarde subpulmonaire (Li et al., 2010). Par ailleurs, des anomalies conotroncale sont observées en cas d'excès ou de déficit d'acide rétinoïque, le dérivé actif de la vitamine A (Li et al., 2010). Des anomalies conotroncale sont observées dans les cœurs à double mutation des récepteurs d'acides rétinoïdes, d'autre part, l'excès de signalisation RA bloque à la fois la migration et la prolifération du CNC (Pan et al., 2007 ; Li et al., 2001) La signalisation RA contrôle la configuration antéro-postérieure du SHF. Ainsi, les gènes Hox, cibles de la signalisation de l'AR, jouent un rôle crucial dans la structuration des cellules progénitrices cardiaques qui contribuent aux deux pôles cardiaques (Bertrand et al., 2011 ; Stefanovic et al., 2020)

(Figure 13). Chez les vertébrés, la perte de l'AR entraîne une dilatation du tube cardiaque qui ne parvient pas à se boucler correctement et à former des cavités le long de l'axe antéropostérieur. La signalisation FGF est nécessaire pour établir l'identité ventriculaire ; par conséquent, la AR limite l'expansion des progéniteurs ventriculaires antérieurs par la répression de *Fgf8* dans la région postérieure du cœur en développement, où les oreillettes se développent. L'AR joue donc un rôle similaire à celui de l'extension de l'axe corporel.

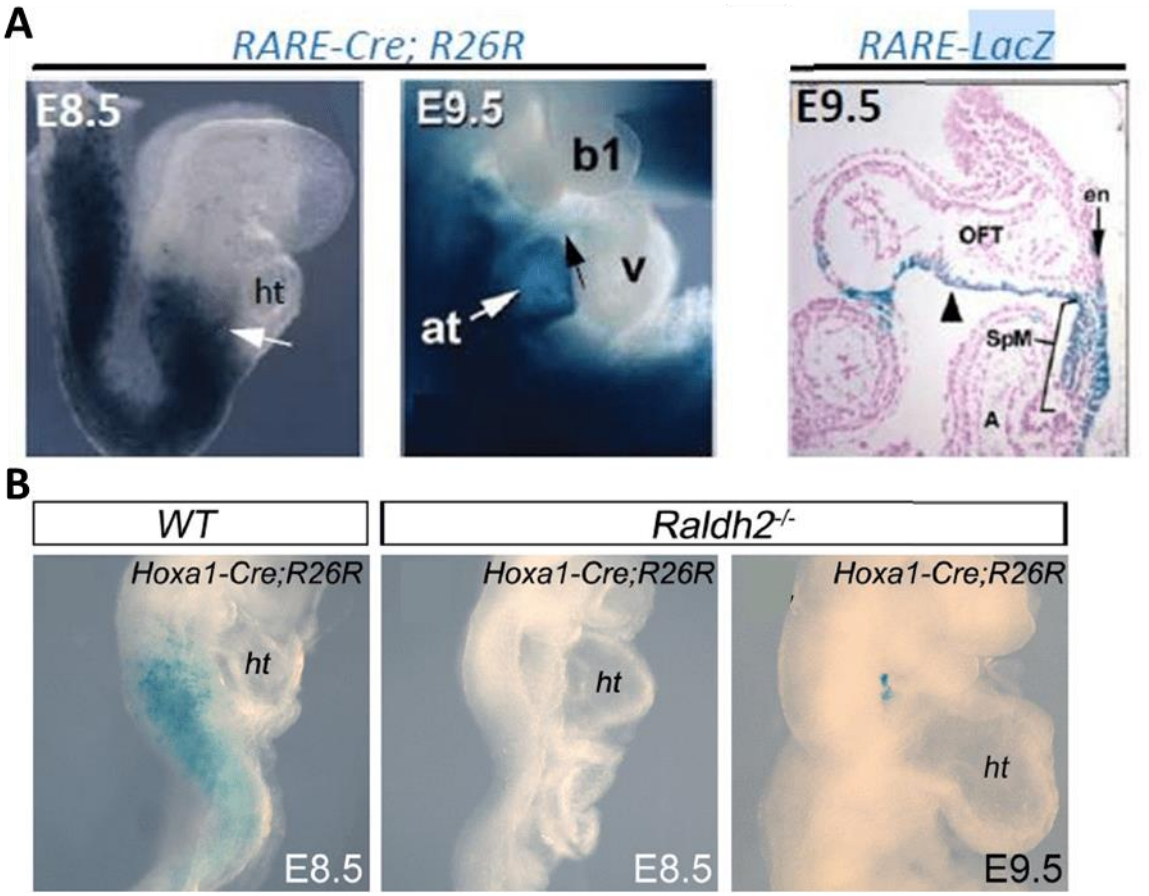


Figure 13 : La réduction ou l'excès de signalisation AR entraîne des anomalies dans la contribution des progéniteurs cardiaques *Hoxa1*$^{+}$.

A) Visualisation de la réponse endogène à l'AR les coupes colorées Xgal d'embryons transgéniques normaux RARE-lacZ (Retinoic Acid Response Element, RARE) sont montrées en E8.75 et E9.5 en coupe sagittales. B) Vues latérales des embryons E8,5 et E9,5. L'activité β-galactosidase est détectée dans l'embryon Hoxa1-enhIII-Cre ; *R26R*, alors qu'aucune cellule marquée au X-gal n'est observée dans les embryons mutants *Hoxa1-enhIII-Cre* ; *R26R* ; *Raldh2*$^{-/-}$, ce qui révèle la nécessité de l'acide rétinoïque pour l'induction de ce transgène (Bertrand et al., 2011 ; Li et al., 2010).

Voie de signalisation BMP

Les protéines morphogéniques osseuses (BMP) ont été initialement découvertes pour leur rôle dans l'induction de la formation osseuse (Katagiri et al., 2016). Ces protéines, appartenant à la superfamille du TGF-β, comprennent environ 20 membres. Parmi lesquels, on trouve les différentes isoformes du TGF-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), les facteurs de croissance BMPs, les facteurs de croissance endothéliaux (VEGFs), ainsi que les facteurs de croissance liés à la morphogénèse (GDFs) et d'autres membres ayant des rôles divers dans la régulation cellulaire et la morphogenèse. La voie BMP commence par la sécrétion de BMP sous forme d'homo- et hétérodimères glycosylés, qui se lient aux récepteurs de type I et II sur la membrane plasmique des cellules (Wang et al., 2014). La formation du complexe hétéromérique sur la membrane plasmique rapproche les récepteurs de type II du récepteur de type I, entraînant la phosphorylation et l'activation du récepteur de type I. Cette activation conduit à une cascade de phosphorylation des protéines SMAD, telles que SMAD1, SMAD5 ou SMAD8. Les SMAD phosphorylés se complexent avec SMAD4, migrent vers le noyau et induisent des changements transcriptionnels dans l'expression des gènes (**Figure 14**). La signalisation BMP joue un rôle crucial dans la différenciation cellulaire, en favorisant la transition des cellules du mésoderme vers des lignées cardiaques. Cette différenciation est facilitée par l'expression simultanée de BMP4 et BMP7 provenant de l'ectoderme, ainsi que de BMP5 et BMP2 de l'endoderme, influençant les cellules du mésoderme voisines (Mensah et Gowher, 2024). La voie BMP, en tant qu'antagoniste de la pluripotence, contribue également à la spécification cardiaque durant le développement.

La régulation précise des signaux de prolifération et de différenciation est importante pour maintenir la population de progéniteurs nécessaire à la formation du pôle artériel. Les études montrent que FGF et BMP agissent comme des signaux opposés régulant le développement des cellules du SHF (Hutson et al., 2010). En effet, la signalisation FGF8 maintient le SHF dans un état prolifératif indifférencié, tandis que BMP agit comme un puissant signal de différenciation myocardique. De plus, FGF peut contrecarrer la différenciation induite par BMP, probablement de manière dépendante de la

concentration. FGF transmet son signal via des voies intracellulaires dépendantes et indépendantes de RAS/ERK. En utilisant des inhibiteurs spécifiques, il a été démontré que la voie Ras/Erk inhibe la différenciation myocardique, tandis que les voies PLCγ et PI3K favorisent la prolifération cellulaire. Il est intéressant de noter que bien que FGF8 inhibe la différenciation myocardique, il favorise en même temps la différenciation des muscles lisses dans les explants du SHF, via une voie dépendante de Ras/Erk. L'importance des voies FGF dépendantes ou indépendantes de Ras dans le développement du pôle artériel a été validée in vivo, où leur perturbation a entraîné des anomalies dans l'alignement du pôle artériel et des malformations de la tige coronaire (Hutson et al., 2010).

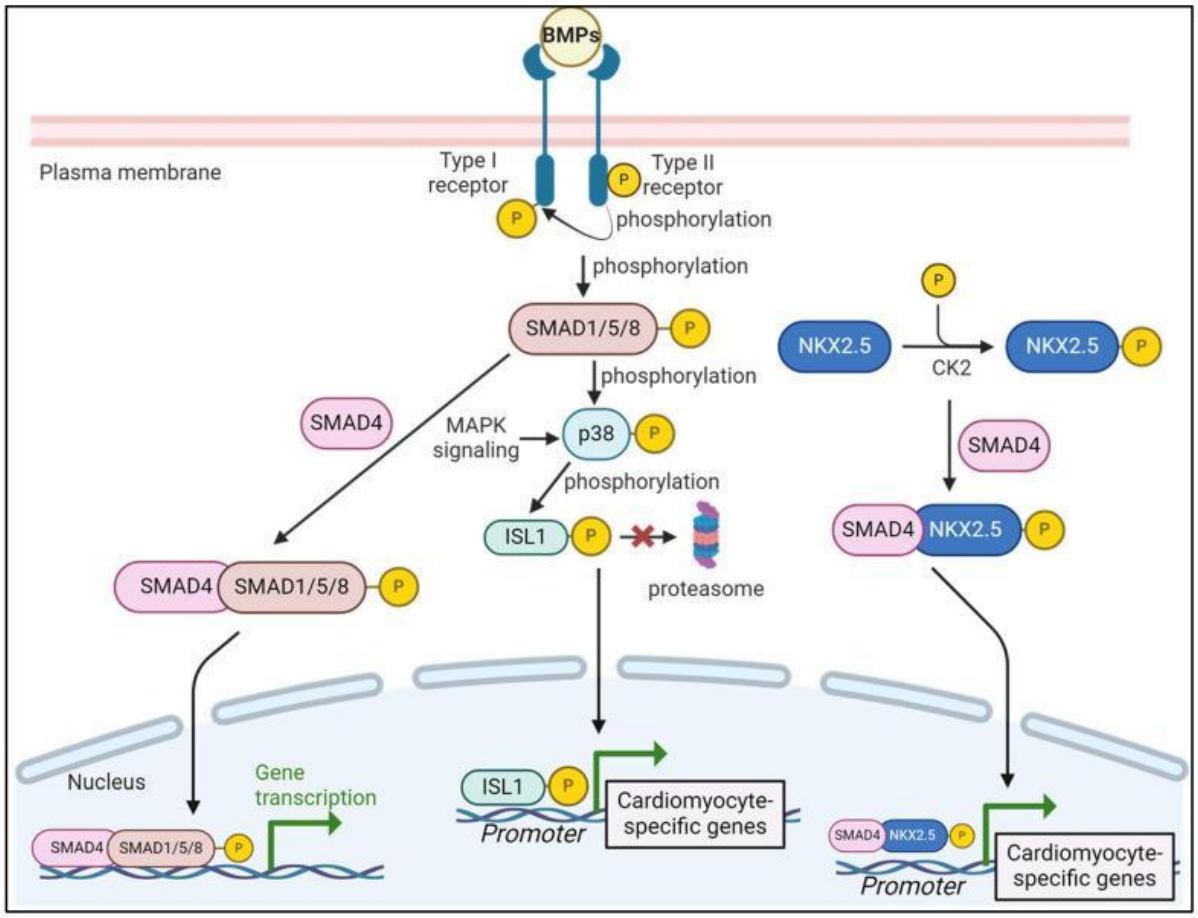


Figure 14: La voie BMP joue un rôle crucial dans la différenciation des cardiomyocytes.

Cette voie de signalisation débute par la liaison des ligands BMP aux récepteurs transmembranaires de types I et II. La phosphorylation de ces récepteurs déclenche la phosphorylation des protéines SMAD, qui s'associent ensuite avec SMAD4 et migrent vers le noyau pour réguler l'expression génique. Les SMAD phosphorylés interviennent

également dans la phosphorylation de p38, une protéine de la voie MAPK, qui à son tour phosphoryle ISL1. Cette phosphorylation empêche la dégradation d'ISL1 par le protéasome et favorise son transport vers le noyau, où ISL1 active les gènes spécifiques aux cardiomyocytes. Par ailleurs, la caséine kinase 2 (CK2) phosphoryle *NKX2-5*, et la forme phosphorylée de *NKX2-5* interagit avec SMAD4 pour promouvoir la translocation de *NKX2-5* dans le noyau, où il stimule également les gènes spécifiques aux cardiomyocytes (Mensah and Gowher, 2024).

Il a été démontré que BMP2, un membre de la famille TGFβ, exerce un effet cardioprotecteur lors d'un infarctus du myocarde (Ebelt et al., 2013). BMP2 active sa signalisation via les récepteurs TGFβ I (ALK1, ALK2, ou ALK3), entraînant l'activation de SMAD1/5/8. Une injection unique de BMP2 après un infarctus du myocarde a montré une réduction de la mort cellulaire par apoptose des cardiomyocytes et une amélioration de la fonction cardiaque, bien que les taux de mortalité des souris n'aient pas été affectés. Parmi les isoformes du TGFβ (1, 2 et 3), le TGFβ1 est le plus étudié et le plus important dans le cœur, où il est libéré par divers types cellulaires, y compris les cardiomyocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages. Les radicaux libres d'oxygène, présents lors d'un infarctus du myocarde, peuvent induire l'activation du TGFβ. Une étude a montré que la N-acétylcystéine réduit les niveaux de TGFβ en piégeant les radicaux libres d'oxygène, suggérant que le TGFβ est régulé par ces radicaux (Euler, 2015). Dans le cœur en développement chez la souris, Bmp4 commence à être exprimé dès E8.5 dans le myocarde de l'OFT et cette expression persiste tout au long du développement embryonnaire (Jiao et al., 2003 ; Liu et al., 2004). À mesure que l'OFT se développe et se remodèle, Bmp4 est également exprimé de manière significative dans l'endoderme et le mésoderme des arcs pharyngiens (Liu et al., 2004). De plus, Bmp4 est présent dès E8.5 au pôle d'entrée du cœur et se retrouve dans les zones essentielles pour l'OFT et la cloison auriculo-ventriculaire (Jiao et al., 2003). BMP4 joue un rôle crucial dans l'expansion et le remodelage normal des coussinets endocardiques au sein de l'OFT ainsi que dans la formation et la maturation des valves semi-lunaires. Ces recherches montrent que le myocarde dérivé du champ cardiaque antérieur est une source essentielle de BMP4, nécessaire pour la septation de l'OFT, le remodelage des coussinets endocardiques et la maturation des valves semi-lunaires (McCulley et al., 2008).

Les résultats in vivo montrent que l'augmentation de la signalisation de SHH provoque une élévation de la signalisation BMP en aval. Cette hausse de la signalisation BMP limite

ensuite l'effet prolifératif de Shh sur les progéniteurs du SHF. Concrètement, une signalisation Shh élevée élargit la zone de prolifération dans le SHF, ce qui réduit la population de cellules capables de contribuer au myocarde (Dyer et al., 2010). Par la suite, la signalisation BMP élevée inhibe l'effet prolifératif induit par Shh, ce qui entraîne une différenciation prématurée des cellules du SHF en cardiomyocytes. Ce processus peut aboutir à des anomalies cardiaques, telles que la sténose des sorties systémiques et pulmonaires, probablement due à une formation incorrecte de la voie d'éjection (Dyer et al., 2010). La signalisation BMP favorise le développement myocardique de l'OFT en régulant le cluster de microARN 17-92 via un élément de liaison Smad conservé, révélant ainsi une nouvelle interaction entre BMP et miARN dans la morphogenèse cardiaque (Wang et al., 2010). De plus, BMP influence l'expression et la fonction de facteurs de transcription clés pour la différenciation des cardiomyocytes, tels que *Hand1*, *Isl1* et *NKX2-5*. Les modèles mutants de perte et de gain de fonction montrent respectivement une réduction et une augmentation de l'expression de Hand1, avec une régulation directe par les SMADs qui se lient aux éléments régulateurs de Hand1(Zheng et al., 2021). BMP favorise également la localisation nucléaire de *NKX2-5* par l'intermédiaire de l'interaction *SMAD4- NKX2-5* (Schultheiss et al.,1997 ; Hu et al., 2021). Par ailleurs, une interaction entre BMP et la signalisation MAPK, via la phosphorylation d'*ISL1* par p38, empêche la dégradation protéasomale d'*ISL1* lors de la différenciation des cardiomyocyte (Jing et al., 2021). Toutefois, certaines études montrent que BMP peut avoir des effets contrastés sur la différenciation cardiaque (de Pater et al., 2012). Il a été précédemment identifié qu'un promoteur spécifique de l'OFT, dépendant des facteurs *BMP, HAND1, HAND2* et *GATA*, était suffisant pour induire l'expression de gènes rapporteurs dans l'OFT en développement ainsi que dans l'aorte (Vincentz et al., 2016). En explorant ces voies transcriptionnelles, un nouvel amplificateur spécifique à l'OFT pour *Hand2* a été découvert, suggérant qu'un mécanisme transcriptionnel dépendant de BMP-GATA régule à la fois *HAND1* et *HAND2*. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les facteurs *HAND* influence la signalisation BMP dans les cellules de la crête neurale cardiaque pour coordonner conjointement la morphogenèse de l'OFT (Vincentz et al., 2021).

La voie de signalisation Notch

La signalisation Notch est une voie de communication intercellulaire hautement conservée, essentielle dans divers processus de développement cardiaque. Elle intervient dans la l'organisation gauche-droite, le développement des vaisseaux sanguins, et la morphogenèse des cavités ventriculaires (Ding et al., 2021). Initialement, l'implication de Notch dans les CHD a été établie lorsque des mutations de NOTCH1 ont été identifiées chez des familles présentant une valve aortique bicuspide à transmission dominante et d'autres anomalies obstructives du tractus d'éjection ventriculaire gauche (Garg et al., 2005). Notch joue un rôle central dans la détermination du destin des cellules cardiaques et la formation des cavités et valves du cœur. Par exemple, elle régule la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules progénitrices du coussin auriculo-ventriculaire, essentielle à la formation du septum auriculo-ventriculaire (Rammah et al., 2022). La signalisation Notch fonctionne par l'activation de son récepteur suite à la liaison avec un ligand, libérant alors le domaine intracellulaire Notch (N1ICD). Ce domaine agit ensuite comme un facteur de transcription, contrôlant l'expression de gènes cibles tels que SNAIL1, HES, HEY, et NRARP.

Hes1, un élément en aval de la voie de signalisation Notch, joue un rôle crucial dans la régulation des populations de cellules souches au cours du développement embryonnaire (Kageyama et al., 2000). Dans les embryons mutants pour *Hes1*, une différenciation accélérée conduit à un épuisement des cellules progénitrices et à un échec de la formation des types cellulaires tardifs (Kageyama et al., 2000). *Hes1* est indispensable pour le déploiement normal des progéniteurs du SHF. Les mutants *Hes1* présentent une prolifération réduite au sein de la SHF et présentent des défauts de migration CNC similaires (Rochais et al., 2009). D'autres études ont également observé des défauts d'alignement de l'OFT chez les embryons mutants pour *Hes1*, ainsi que des anomalies des artères de l'arc aortique, liées à une contribution défectueuse des muscles lisses à E11.5 (Rochais et al., 2009).

Des variantes délétères rares de *NOTCH1* ont été identifiées chez des patients ayant de forts antécédents familiaux de CHDs. Ces mutations de *NOTCH1* sont principalement

associées à des lésions du côté gauche du cœur, mais des études ont également identifié des anomalies du côté droit et conotroncales chez des individus atteints de CHDs familiales. Ainsi, des variants rares ont été identifiées chez des patients atteints de bicuspidie aortique nécessitant un remplacement de la racine aortique, ainsi que chez des patients atteints de syndrome d'hypoplasie du cœur gauche. *JAG1*, un effecteur en amont de Notch, est également associé à la tétralogie de Fallot. L'expression de Notch et de ses cibles en aval est réduite chez les souris présentant des mutations dans la voie de signalisation *Slit/Robo,* ce qui entraîne des défauts de communication interventriculaire et des valves aortiques bicuspides (Williams et al., 2019). Des mutations rares présentent dans des parties codantes du gène *MIB1*, qui active la voie Notch, ont été identifiées dans une cohorte de CHDs chinoises Han. Ces mutations réduisent la fonction de *MIB1*, entraînant une moindre ubiquitination de *JAG1* et une induction réduite de Notch (**Figure 15**). En outre, plusieurs autres voies de signalisation telles que Fgf, Bmp, Shh, Wnt, Pdgf, endothéline, oxyde nitrique, et polarité des cellules planaires, sont impliquées dans le maintien des CCNC et influencent les autres lignées cellulaires de l'OFT. Ces cascades de signalisation jouent un rôle direct ou indirect dans la spécification et la fonction des différentes lignées cellulaires du pôle artériel.

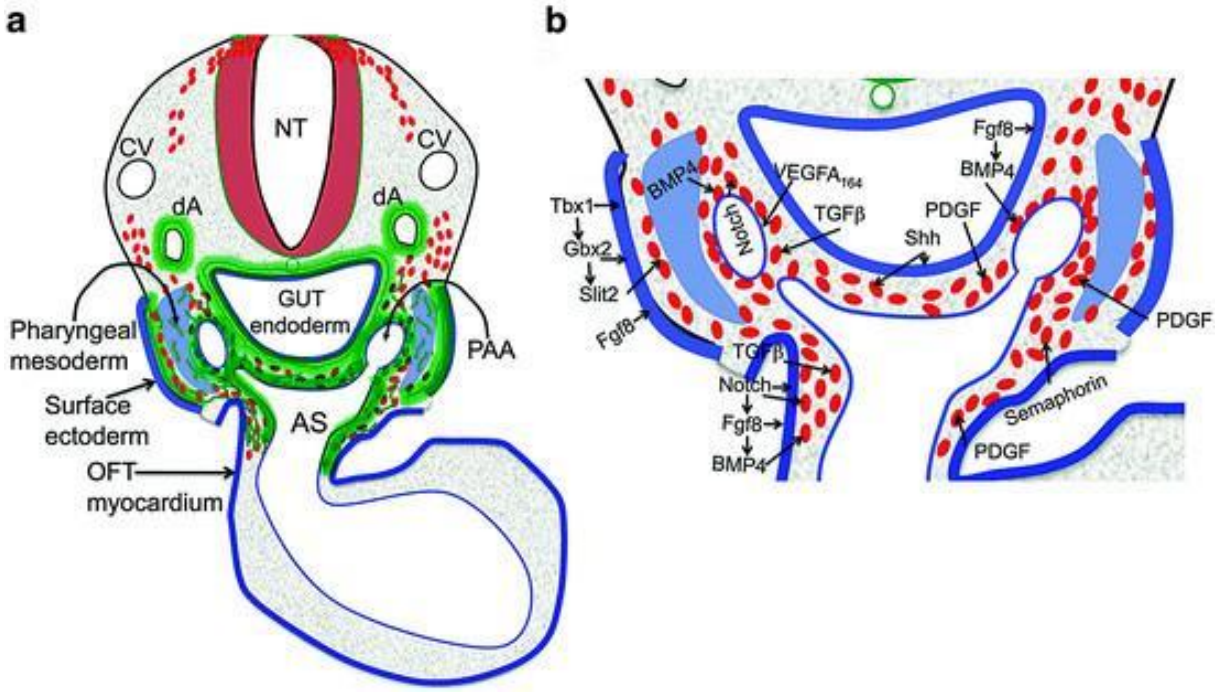


Figure 15 : Les voies de signalisation dans le microenvironnement pharyngé.

(a) Accumulation tissulaire de la protéine Fibronectine dans la région du pharynx. Une représentation schématique en coupe transversale d'un embryon E9,5 est présentée NT tube neural, CV veine cardinale, dA aorte dorsale, PAA artère de l'arc pharyngien, AS sac aortique, et OFT outflow tract. Les zones enrichies en protéine Fibronectine sont indiquées en vert. Les cellules dérivées de la crête neurale sont symbolisées par des ovales rouges. La partie dorsale est située en haut, tandis que la partie ventrale est en bas. (a) met en évidence quelques exemples de voies de signalisation connues pour réguler les interactions entre l'endoderme, le mésoderme, l'ectoderme de surface et les cellules de la crête neurale au cours de la morphogenèse cardiovasculaire. La protéine Fibronectine est concentrée à des emplacements stratégiques et est susceptible de réguler certaines des voies de signalisation intercellulaires représentées. (b) Un zoom sur la région pharyngée présentée. (Adapté de Wang and Astrof, 2013)

Le ligand non canonique de *NOTCH*, *DLK1*, est un régulateur potentiel en amont de la signalisation *NOTCH/HES1* dans la paroi supérieure de l'OFT. Dans cette région, la signalisation *NOTCH/HES1* réprime l'expression de *Pparγ* (Rammah et al., 2022). La présence d'une signalisation NOTCH active dans le sOFT suggère que l'activation régionale de la voie *NOTCH/HES1* dans le SHF joue un rôle clé dans le déploiement des progéniteurs myocardiques sous-aortiques vers le sOFT. Il a également été montré que l'inactivation spécifique de NOTCH dans le SHF entraîne des malformations cardiaques, telles que le tronc artériel persistant ou le ventricule droit à double sortie, en raison de perturbations dans l'apport des cellules de la crête neurale cardiaque (High et al., 2009). Par ailleurs, le futur myocarde sous-aortique exprime des niveaux élevés de *DLK1*, ce qui, augmente l'immuno-réactivité de *N1ICD* et l'expression de *Hes1* dans l'OFT, suggérant que *DLK*1 active la voie *NOTCH* pendant la morphogenèse cardiaque précoce (Rammah et al., 2022).

La voie de signalisation PPAR

Les PPARs sont une famille de récepteurs nucléaires qui inclut trois isoformes : *PPARα*, *PPARβ/δ* et *PPARγ*. Chacune de ces isoformes a des fonctions distinctes et des tissus cibles spécifiques. Malgré leurs nombreuses similitudes, chaque isoforme de *PPAR* présente des fonctions uniques *in vivo*, probablement en raison de leurs distributions tissulaires

distinctes, de réponses différentielles à divers ligands et de différences inhérentes dans leurs propriétés biochimiques. *PPARα*, le premier *PPAR* identifié, est principalement exprimé dans le foie, le cœur et le tissu adipeux brun (BAT) (Nedergaard et al., 2005). *PPARγ,* quant à lui, est fortement exprimé dans le tissu adipeux blanc (WAT) et le BAT, où il régule principalement l'adipogenèse et exerce un contrôle puissant sur le métabolisme lipidique global et la sensibilité à l'insuline. En se liant à des éléments régulateurs sensibles aux *PPAR*, en tant qu'hétérodimères obligatoires avec le récepteur à l'acide rétinoïque, les *PPAR* régulent l'expression de réseaux de gènes impliqués dans l'adipogenèse, le métabolisme des lipides, l'inflammation et le maintien de l'homéostasie métabolique (Gallardo-Soler et al., 2008). Il est impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules cardiaques, et son activation est essentielle pour le maintien de la fonction myocardique. Des études ont montré que *PPARγ* contribue à la régulation de la réponse inflammatoire dans le cœur et peut influencer la réparation myocardique après des lésions.

De plus, *PPARγ* interagit avec d'autres voies de signalisation métabolique et inflammatoire, ce qui en fait un acteur clé dans le développement et le remodelage du tissu cardiaque. Bien que *PPARα* et *PPARγ* partagent des fonctions métaboliques communes, leur rôle dans le développement cardiaque et la régulation de la santé cardiaque souligne leur importance unique et complémentaire (Ahmadian et al., 2013). *PPARγ* a été identifié comme un régulateur clé de l'identité transcriptionnelle régionale dans l'OFT. Il est exprimé de manière différentielle dans les parois supérieure et inférieure de l'OFT, ce qui suggère qu'il joue un rôle dans la spécification régionale de cette structure cardiaque. L'analyse des profils d'expression génique a révélé que *PPARγ* est enrichi dans l'OFT inférieur, tandis que *PPARα* présente une expression moins marquée, indiquant que *PPARγ* pourrait agir comme un régulateur en amont de l'identité transcriptionnelle régionale dans cette région du cœur (Rammah et al., 2022) (**Figure 16**). Des récentes études montrent l'interaction entre *PPARγ* et la signalisation *NOTCH*. Les résultats suggèrent que la voie *NOTCH*, via le ligand *DLK1*, réprime l'expression de *PPARγ* et de ses cibles en aval dans l'OFT supérieur. En revanche, *TBX1*, un facteur de transcription, active la signalisation *PPARγ* dans l'iOFT. Cette régulation complémentaire entre *PPARγ* et *NOTCH* est essentielle pour établir l'identité transcriptionnelle régionale

dans l'OFT, soulignant l'importance de l'interaction entre ces deux voies dans le développement cardiaque (Rammah et al., 2022).

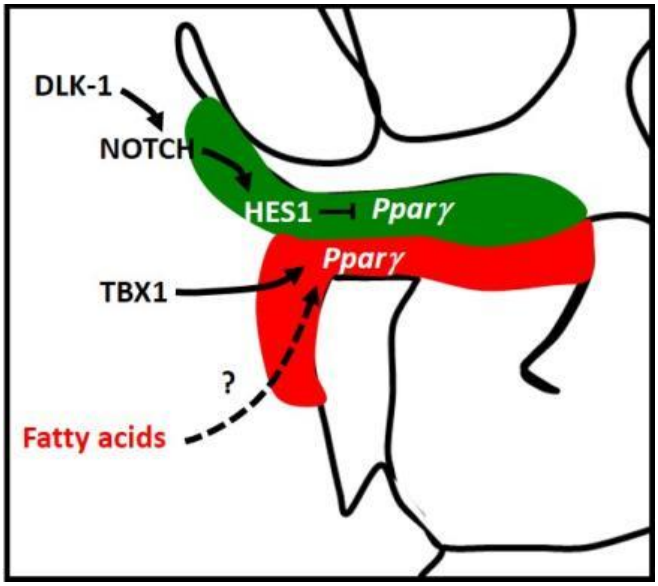


Figure 16 : Les gènes des voies de signalisation dans le sOFT et du iOFT.

Les gènes régulant DLK-1 activent la voie *NOTCH/HES1*, ce qui inhibe *PPARγ* dans la partie supérieure de l'OFT (en vert). Tant *TBX1* que *PPARγ* sont nécessaires pour le développement de la partie inférieure de l'OFT (en rouge) (Rammah et al., 2022).

Chapitre II : Les pathologies cardiaques congénitales qui affectent le pôle artériel

A. Origines génétiques

La cardiopathie congénitale représente une forme courante de malformation congénitale, affectant environ 1 % des nouveau-nés chaque année. Les perturbations du développement cardiaque entraînent une variété de malformations, et bien que des facteurs environnementaux puissent contribuer à la survenue de ces anomalies, un fondement génétique solide est soutenu par des preuves telles que le risque élevé de récurrence et les formes familiales de la maladie, ainsi que par l'association bien établie avec des anomalies chromosomiques (Pierpont et al., 2018). Les mutations dans les gènes codant des facteurs de transcription, des transducteurs de signalisation cellulaire et des modificateurs de la chromatine peuvent perturber la spécification, la différenciation et la structuration des types cellulaires essentiels au développement cardiaque, entraînant des anomalies de la structure et de la fonction cardiaques (Lage et al., 2012 ; Li et al., 2015). Étant donné que de nombreuses protéines issues de ces gènes interagissent de manière synergique ou sont liées par des réseaux fonctionnels, il est suggéré qu'un large réseau d'interactions puisse être impliqué dans la maladie. Toute perturbation pendant le développement, notamment lors de la formation de l'OFT, peut conduire à des malformations cardiaques congénitales graves (**Figure 17**), telles que la tétralogie de Fallot, la transposition des gros vaisseaux, le tronc artériel commun, la sténose pulmonaire congénitale, des DORV et le défaut du septum interventriculaire associé à l'OFT (Ahuja et al., 2007 ; Bruneau, 2013 ; Rochais et al., 2009) . Bien que les cas familiaux de la TOF soient rares, probablement en raison de la gravité de la maladie, des variants héréditaires des gènes *GATA4, NKX2-5, JAG1, FOXC2, TBX5* et *TBX1* ont été identifiées (Morgenthau et Frishman, 2018; Althali et Hentges, 2022). Cependant, malgré ces avancées, environ 60% des cas de cardiopathie congénitale restent inexpliqués, en partie en raison de la complexité de la diversité génétique chez les sujets humains, ce qui complique les études sur l'étiologie génétique de ces maladies (Zaidi et Brueckner, 2017).

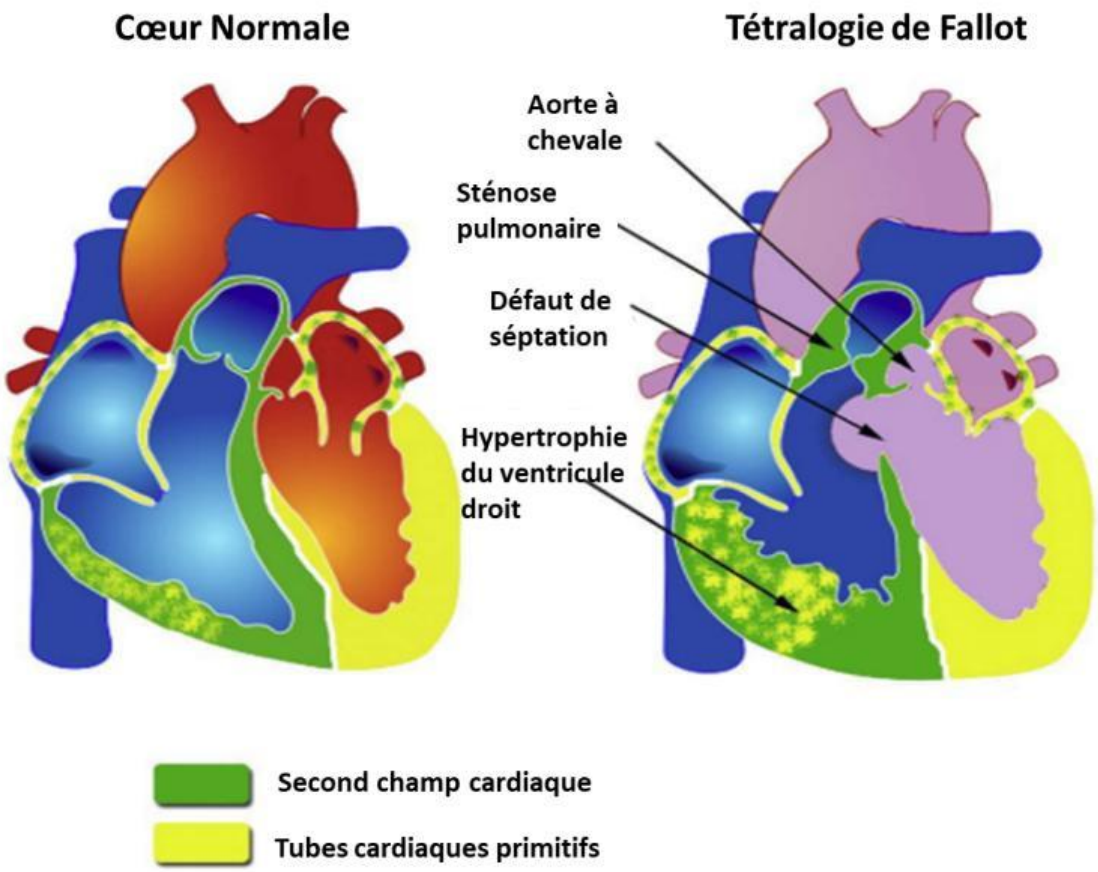


Figure 17 : La Tétralogie de Fallot (ToF) ; exemple résultant d'un développement défectueux du SHF.

Ce syndrome se caractérise par quatre anomalies majeures (à droite) : une aorte à cheval, une sténose pulmonaire (rétrécissement de la sortie du ventricule droit), une anomalie de la septation ventriculaire entraînant une communication interventriculaire, et une hypertrophie du ventricule droit, le tout en contraste avec la structure normale du cœur adulte (à gauche). Les régions issues des tubes cardiaques primitifs (indiquées en jaune) et du second champ cardiaque (surlignées en vert), soulignent les zones spécifiques impliquées dans le développement défectueux observé dans la Tétralogie de Fallot. (Adaptée de Di Felice and Zummo, 2009.)

iii. *Tbx1*- Le syndrome de DiGeorge

Le syndrome de délétion 22q11.2, anciennement connu sous le nom de syndrome de DiGeorge, a été décrit pour la première fois par Angelo DiGeorge en 1968 chez des patients présentant une absence de tissu thymique et des glandes parathyroïdes. Ce

syndrome est le plus courant des syndromes de micro-délétion chez l'Homme, affectant environ 1 naissance sur 4000. Il résulte du développement anormal des troisième et quatrième poches pharyngées, ce qui entraîne des caractéristiques typiques telles que des anomalies cardiaques, une hypoparathyroïdie et une hypoplasie ou une aplasie thymique. D'autres manifestations phénotypiques peuvent inclure des anomalies palatines, des troubles de l'alimentation et de la déglutition, des troubles neuropsychiatriques, des anomalies rénales, etc., avec une grande variabilité des symptômes. Environ 75 à 80 % des personnes atteintes de 22q11.2DS présentent des troubles du système immunitaire, ce qui les rend plus susceptibles aux infections, aux maladies auto-immunes et à l'atopie. Le syndrome peut être classé en deux catégories principales : le syndrome de DiGeorge complet et le syndrome de DiGeorge partiel. Les individus présentant une absence totale de thymus sont considérés comme ayant le syndrome de DiGeorge complet, une condition qui touche moins de 1,5 % des personnes avec une délétion 22q11.2 et peut être traitée par transplantation thymique. En revanche, ceux atteints du syndrome de DiGeorge partiel possèdent du tissu thymique, parfois en quantité microscopique, et présentent une variabilité importante des déficits immunitaires (Biggs et al., 2023).

Il est important de noter que, dans de nombreux cas présentant uniquement ces malformations cardiaques conotroncales, la délétion de la région 22q11.2 n'est pas détectable par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), une méthode couramment utilisée pour identifier cette délétion dans le syndrome de DiGeorge. Le gène candidat du syndrome de DiGeorge, *TBX1*, situé sur le chromosome 22q11.2, est crucial pour le développement de la voie d'éjection cardiaque. Les patients atteints de ce syndrome présentent des anomalies craniofaciales et cardiovasculaires notables, telles que l'interruption de l'arc aortique, la tétralogie de Fallot et le tronc artériel commun (Théveniau-Ruissy et al., 2008 ; Szczawińska-Popłonyk et al., 2023). La malformation de l'OFT, qui évolue en myocarde à la base de l'aorte ascendante et de l'artère pulmonaire, est observée dans environ un tiers des malformations cardiaques congénitales humaines. Elle constitue un symptôme fréquent de troubles génétiques complexes, tels que le syndrome de DiGeorge (délétion 22q11.2), associé à l'haploinsuffisance de *TBX1*. Bien que des mutations de *TBX1*, qui est exprimé dans l'OFT, ont été trouvées chez des patients atteints du syndrome de DiGeorge, chez certain patients, aucune anomalie n'a été identifiée dans la région codante du gène *TBX1*. Cependant, la délétion des gènes *DGCR6*

et *PRODH* qui influence l'expression du gène *TBX1* pourrait également être responsable du développement des malformations cardiaques conotroncales observées chez les patients. Ces gènes peuvent être considérés comme des gènes modificateurs car leur altération influence le phénotype clinique en modulant l'expression ou la fonction des gènes clés impliqués dans ces malformations. Par conséquent, il est crucial de comprendre les mécanismes développementaux impliqués dans la formation de l'OFT pour développer des approches diagnostiques et thérapeutiques pour les anomalies cardiaques liées à l'OFT chez l'homme.

iv. Notch Jag1

La signalisation Notch régule le destin des cellules cardiaques et la morphogenèse des cavités et des valves. Les protéines *NOTCH1* à *NOTCH4*, conservées au cours de l'évolution, influencent fortement les décisions de destin cellulaire (Andersson et al., 2011). L'expression séquentielle des composants de Notch et de gènes associés est cruciale pour le développement vasculaire et cardiaque (Luxán et al., 2016). Cette voie est nécessaire à la formation des trabécules cardiaques et à la compaction du myocarde. Les variations des gènes de signalisation *NOTCH* provoquent diverses anomalies cardiovasculaires (Luxán et al., 2016). Une étude récente a identifié cinq nouveaux variants de novo de *NOTCH1* dans la tétralogie de Fallot, incluant trois mutations faux-sens et deux variantes tronquées (Page et al., 2019). Les mutations de *NOTCH1* et du ligand *Notch DLL4* sont couramment associées au syndrome d'Adams-Oliver, un syndrome rare combinant maladies cardiaques, aplasie cutanée du cuir chevelu et anomalies des membres. Le syndrome d'Alagille (dysplasie artériohépatique) est un syndrome héréditaire autosomique dominant caractérisé par une maladie hépatique cholestatique, des degrés variables d'atteinte rénale et problèmes cardiaques qui est le plus souvent TOF. Des mutations dans le ligand Notch *JAG1* sont trouvées chez ~90% des patients atteints du syndrome d'Alagille (Li et al., 1997), et des mutations du récepteur *NOTCH2* sont observées chez 2 % des personnes atteintes du syndrome d'Alagille (McDaniell et al., 2006). À l'instar des mutations chez d'autres membres de la voie Notch, les mutations *JAG1* sont à l'origine des défauts cardiaques et isolées, notamment TOF (Eldadah et al., 2001). Enfin, *GALNT11*, qui est nécessaire pour l'étape de clivage S2 du traitement du récepteur Notch, a été liée à

HTX humain en affectant la spécification médiée par Notch de la fonction des cils au niveau de l'organisateur gauche-droite (Boskovski et al., 2013).

v. NKX2-5

Le facteur de transcription humain *NKX2-5* est le premier gène associé au développement cardiaque humain. Il se trouve dans la région du chromosome cinq 5q34-q35 et est abondamment exprimé dans le cœur du fœtus humain (Shinebourne et al., 2006). Un rôle essentiel de *NKX2-5* au cours du développement du champ cardiaque secondaire est ses interactions avec le réseau plus large de facteurs transcriptionnels qui régulent la différenciation et le destin cardiaques (Clark et al., 2013). De plus, la délétion de *NKX2-5* a été associée à des anomalies de la structure du cœur embryonnaire, à un retard de croissance et à la mortalité embryonnaire chez la souris (Lyons et al., 1995). Les mutations de *NKX2-5* ont été l'une des premières mutations ponctuelles héréditaires clairement démontrées comme causant des défauts cardiaques humaine. *NKX2-5* est un régulateur transcriptionnel qui interagit avec *GATA4* pour spécifier le mésoderme cardiaque, identifié pour la première fois chez les mutants *de la drosophile* qui n'ont pas réussi à former un tube cardiaque (Bodmer et al., 1993). Il est intéressant de noter que ces premières études cliniques décrivant les mutations de *NKX2-5* ont permis d'identifier d'autres membres de la famille présentant des malformations cardiaques, y compris celles de la TOF. Bien que les études épidémiologiques sur le TOF soient limitées par la taille de la population, les estimations actuelles basées sur des populations de patients américains suggèrent que *NKX2-5* représente >4% des cas de TOF non syndromiques (Goldmuntz et al., 2001).

B. Les pathologies environnementales

L'environnement fœtal *in utero* exerce une influence déterminante sur le développement du fœtus pendant la gestation, ce qui peut avoir des répercussions à long terme sur la santé. Au cours de la dernière décennie, l'incidence des malformations

congénitales a été en augmentation, en parallèle avec une préoccupation croissante concernant les expositions environnementales pendant la grossesse et leur lien potentiel avec la cardiopathie congénitale. Des études antérieures, telles que l'étude sur les nourrissons de Baltimore-Washington, ont établi des associations entre divers facteurs environnementaux et des sous-types spécifiques de cardiopathies congénitales (Alverson et al., 2011).

Une perspective émergente dans l'étude des CHD suggère que les défauts placentaires pourraient jouer un rôle significatif. Des études ont révélé des anomalies significatives dans les placentas de fœtus présentant des cardiopathies congénitales telles que le syndrome hypoplasique du cœur gauche ou la transposition des grandes artères. Dans les placentas des fœtus atteints de syndrome hypoplasique du cœur gauche, une diminution des capacités de transport placentaire a été observée, suggérant un lien entre les anomalies placentaires et les malformations cardiaques congénitales. De plus, des changements microvasculaires ont été détectés dans les placentas des fœtus atteints à la fois de transposition des grandes artères et de syndrome hypoplasique du cœur gauche (Courtney et al., 2018).

vi. Facteurs environnementaux toxiques et leur impact sur le développement cardiaque

Le diabète maternel, la grippe, le traitement à l'ibuprofène, l'alcool, le tabagisme parental et les carences nutritionnelles ont été identifiés comme des facteurs de risque potentiels pour certaines malformations cardiaques congénitales (Alverson et al., 2011).Des recherches ont révélé que les mères fumeuses présentaient un risque accru d'avoir des enfants atteints de malformations cardiaques congénitales, en particulier des anomalies septales auriculaires de type secundum, des anomalies de l'obstruction de la voie d'écoulement du ventricule droit et des communications interventriculaires et atrioventriculaires (AVSD) sans syndrome de Down. Les données ont montré que les femmes qui fumaient pendant leur grossesse présentaient un risque accru de 44 % d'avoir

un enfant atteint d'une malformation septale par rapport aux femmes qui ne fumaient pas pendant leur grossesse (Alverson et al., 2011 ; Lee and Lupo, 2013).

Le lien entre la consommation d'alcool pendant la grossesse et les anomalies cardiaques congénitales reste controversé, bien que des études aient montré que même de faibles niveaux d'exposition prénatale à l'alcool peuvent entraîner des anomalies cardiaques congénitales, telles que le syndrome d'alcoolisation fœtale. Jusqu'à 54 % des enfants nés vivants atteints de SAF présentent des anomalies cardiaques (Sun et al., 2015 ; Karunamuni et al., 2014).

En ce qui concerne les infections virales maternelles, leur association avec le risque de cardiopathies congénitales chez les nouveau-nés est également débattue. Une étude récente menée en 2019 a analysé de manière exhaustive les données disponibles et a révélé des résultats intéressants. Les chercheurs ont constaté que les mères infectées par le virus de la rubéole et le cytomégalovirus en début de grossesse présentaient un risque accru de donner naissance à des enfants présentant des cardiopathies congénitales. Cependant, d'autres infections virales maternelles telles que le virus de l'herpès, le virus de l'hépatite B et le virus Coxsackie n'ont pas été significativement associées à un risque accru de cardiopathies congénitales chez les nouveau-nés (Ye et al., 2019).

Au début des années 1950, des rapports initiaux ont noté une augmentation des taux de troubles du spectre autistique et de persistance du canal artériel chez les nourrissons nés à des températures élevées. Des recherches sur des souris ont également révélé les effets néfastes de l'hypoxie sur le développement du cœur embryonnaire. Des études ultérieures ont montré que l'exposition maternelle à des niveaux d'oxygène réduits pendant la gestation peut entraîner des défauts cardiaques chez le fœtus, affectant principalement la prolifération des cellules progénitrices cardiaques. Cela peut conduire à des anomalies telles qu'une orientation incorrecte de l'OFT et des malformations coronariennes (Kalisch-Smith et al., 2020). D'autres recherches ont montré que l'exposition à une hypoxie modérée pendant la gestation peut réduire les niveaux d'un facteur de transcription cardiaque crucial, le *NKX2-5*, conduisant à des malformations cardiaques. De plus, lorsque des embryons présentant une mutation génétique associée aux malformations cardiaques sont exposés à l'hypoxie *in utero*, cela aggrave encore ces

anomalies ou peut même entraîner la mort embryonnaire. Cette interaction entre les gènes et l'environnement peut expliquer pourquoi les taux de malformations cardiaques complexes sont moins élevés dans les populations vivant à haute altitude, où l'hypoxie est plus fréquente. Le tabagisme maternel est une autre source d'exposition hypoxique pour le fœtus. Bien que des études aient montré un risque légèrement accru de malformations cardiaques chez les enfants de mères fumeuses, les raisons de cette disparité par rapport à d'autres formes d'hypoxie embryonnaire ne sont pas encore bien comprises.

Au cours de la grossesse, des modifications se produisent dans le métabolisme du glucose, notamment une augmentation des besoins en insuline maternelle et une résistance à l'insuline accrue au cours du dernier trimestre, ainsi que des hormones inhibant son action, ce qui stimule une production accrue d'insuline par le pancréas. Normalement, un équilibre de la glycémie fœtale est maintenu. Cependant, à un stade avancé de la gestation, il y a une diminution significative de l'absorption du glucose dans les cellules cardiaques fœtales pour favoriser une bonne cardiogenèse embryonnaire. L'hyperglycémie est identifiée comme le principal agent tératogène dans cette relation, et sa présence aux premiers stades de l'embryogenèse cardiaque semble favoriser l'apparition de malformations cardiaques congénitales (Maduro et al., 2022). Le diabète sucré est un trouble métabolique caractérisé par une hyperglycémie causée par divers dysfonctionnements de l'insuline, tels que sa mauvaise sécrétion ou action. Actuellement, environ 425 millions de personnes sont touchées par le diabète, un nombre qui devrait augmenter à 629 millions d'ici 2045. Il existe trois principaux types de diabète : le type I, résultant souvent d'une destruction auto-immune des cellules bêta pancréatiques et entraînant une production d'insuline insuffisante ; le type II, souvent associé à l'obésité et au vieillissement, caractérisé par une insuffisance de sécrétion d'insuline et une résistance à celle-ci ; et le diabète gestationnel, une forme transitoire qui se développe pendant la grossesse et disparaît après l'accouchement. Les enfants de mères atteintes de diabète préexistant (types I et II) ont un risque d'incidence de CHD environ trois fois plus élevé que la normale, tandis que le diabète gestationnel augmente ce risque d'environ 1,5 fois. Ce risque persiste même après ajustement pour des facteurs tels que l'indice de masse corporelle maternelle, la consommation d'alcool et l'âge. De plus, ces enfants ont également un risque accru d'autres anomalies du développement, telles que le spina bifida, l'anencéphalie, les anomalies craniofaciales et la macrosomie. Les mécanismes

potentiels par lesquels l'hyperglycémie peut conduire à la CHDs incluent l'hypoxie, le stress oxydatif, l'activation de certaines voies métaboliques et l'augmentation de l'apoptose cellulaire. Cependant, étant donné la nature multifactorielle du diabète, il est probable qu'une combinaison de ces mécanismes contribue au développement de la CHDs (Kalisch-Smith et al., 2020).

Pour conclure, parmi les deux dernières causes importantes de CHD figurent l'obésité maternelle, abordée dans la section suivante, et le diabète. Il devient de plus en plus clair que, durant les premières semaines de la vie fœtale, lorsque la plupart des organes se forment, le fœtus dépend largement des ressources maternelles pour son apport en nutriments. Cette dépendance suggère que l'obésité maternelle pourrait avoir un impact significatif sur le développement fœtal.

C. L'obésité maternelle

Le surpoids ou l'obésité est connu comme étant associé à un risque accru de malformations cardiaques congénitales chez les nouveau-nés. Les maladies cardiaques figurent parmi les principales causes de décès au cours de la première année de vie dans les pays à ressources élevées. Bien que la plupart des enfants atteints de malformations cardiaques survivent jusqu'à l'âge adulte, ces affections sont associées à une importante mortalité, morbidité et réduction de la qualité de vie (Abassi et al., 2020). Des études récentes ont mis en évidence l'impact de l'obésité sur les malformations cardiaques congénitales. L'Organisation mondiale de la santé définit l'indice de masse corporelle (IMC) comme le poids en kilogrammes divisé par la taille en mètres carrés. Un IMC est considéré comme sous-poids lorsque celui-ci est inférieur à 18,5, normal lorsque compris entre 18,5 et 24,9, en surpoids entre 25,0 et 29,9, et obèse à partir de 30,0 (Persson et al., 2017).

vii. Impact de l'obésité maternelle sur le développement de pathologies cardiaques congénitales.

Ces deux dernières décennies, différentes études ont été réalisés avec pour objet une corrélation significative entre l'obésité et les maladies cardiaques congénitales. Une méta-analyse des données collectées entre 1966 et 2008 a conclu que l'obésité maternelle augmentait le risque de nombreuses anomalies congénitales, y compris les malformations cardiovasculaires, les anomalies septales, et d'autres types d'anomalies graves (Stothard et al., 2009). Une autre étude aux États-Unis a confirmé que l'obésité maternelle était associée à un risque accru de maladies coronariennes et de malformations cardiaques chez le fœtus, comme la tétralogie de Fallot et le syndrome du cœur gauche (Gilboa et al., 2010). Ces études montrent que l'obésité maternelle augmente significativement le risque de malformations congénitales, notamment celles affectant l'outflow tract cardiaque. Ces malformations comprennent la tétralogie de Fallot, l'obstruction des voies d'éjection cardiaques, et d'autres anomalies graves qui peuvent avoir des impacts durables sur la santé de l'enfant. L'obésité maternelle est donc un facteur de risque majeur dans le développement de ces malformations cardiaques complexes.

Une étude sur une cohorte de femmes, couvrant la période de janvier 2001 à décembre 2014, a inclus 1 243 957 nouveau-nés vivants. Parmi ceux-ci, 43 550 (soit 3,5 %) présentaient une malformation congénitale majeure. Les malformations cardiaques congénitales étaient les plus fréquentes (1,6 %), suivies des anomalies des organes génitaux (0,5 %), des membres (0,4 %), du système urinaire (0,3 %), et d'autres types tels que les anomalies oculaires, du système digestif, les fentes oro-faciales, et les anomalies du système nerveux. Les malformations étaient plus fréquentes chez les enfants de mères obèses, avec une incidence allant de 3,8 % pour l'obésité de classe I à 4,7 % pour l'obésité de classe III, contre 3,4 % pour les mères de poids normal (Persson et al., 2017).

Une autre étude menée en Suède de 1992 à 2012 sur 1 747 412 nourrissons a montré une augmentation des malformations cardiaques congénitales en fonction de l'IMC maternel. Le risque de transposition des grandes artères, ainsi que d'anomalies de la crosse aortique, augmentaient significativement avec la gravité de l'obésité maternelle (Persson et al., 2019) (**Figure 18**).

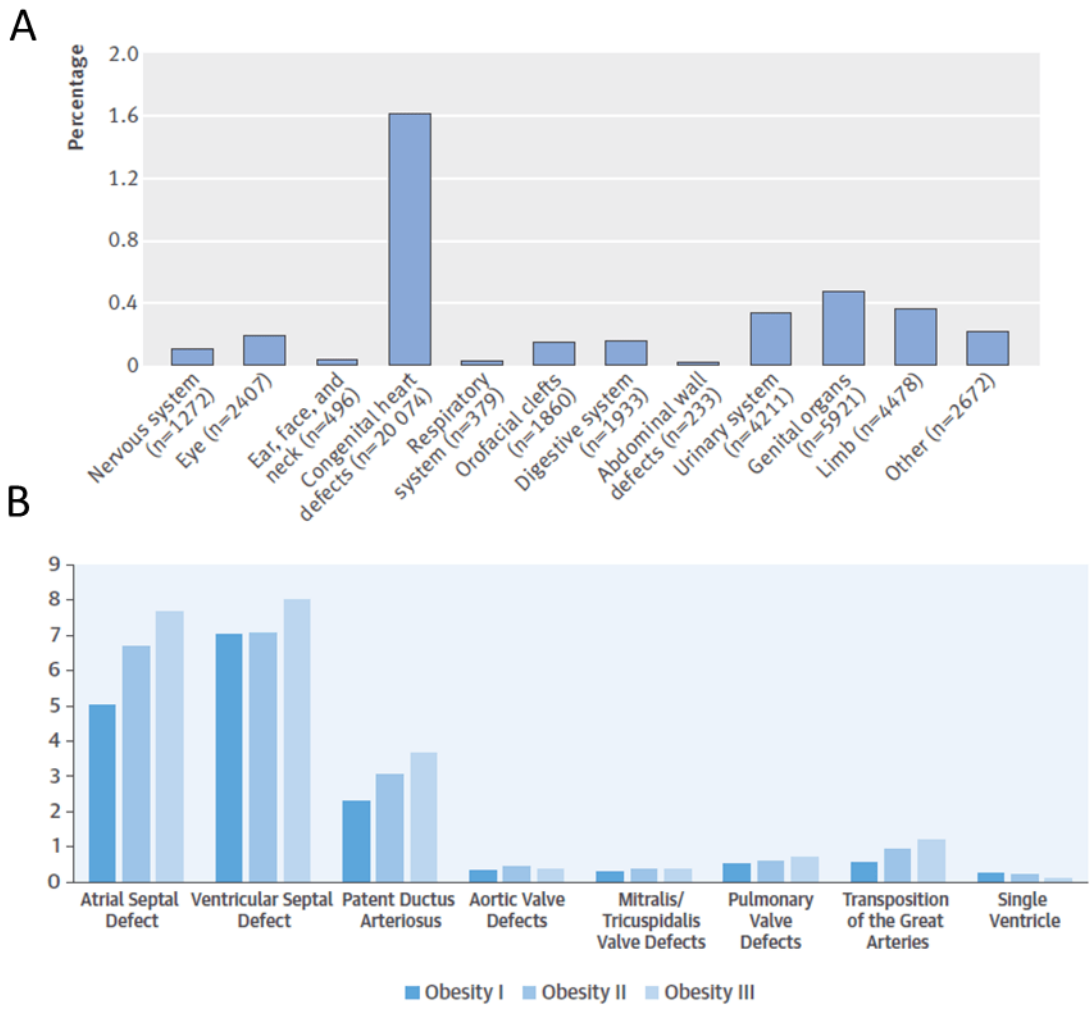


Figure 18 : Tableau des défauts congénitaux lié à l'obésité maternelle.

A) Prévalence des malformations congénitales majeures chez les naissances vivantes uniques en Suède entre 2001 et 2014. B) Prévalence des malformations cardiaques congénitales majeures chez les naissances vivantes uniques en Suède entre 1992 au 31 décembre 2012. (Adapté de Persson et al., 2017 et Persson et al., 2019)

De plus, une étude nationale en Finlande (2006-2016) a trouvé que le surpoids maternel était lié à des anomalies cardiaques telles que l'obstruction de la voie d'éjection du ventricule gauche et les communications interventriculaires. L'obésité maternelle était associée à des anomalies cardiaques complexes et à l'obstruction de la voie d'éjection droite (Turunen et al., 2024).

viii. Relation entre l'obésité maternelle et les pathologies cardiaques congénitales : les lipides circulants.

Les lipides circulants, tels que le cholestérol, les triglycérides, et les lipoprotéines et les adiponectines sont des facteurs de risques majeurs pour les maladies cardiovasculaires. Alors que les niveaux de glucose circulant chez le fœtus sont comparables à ceux du nouveau-né et de l'adulte, les concentrations d'acides gras sont nettement plus faibles pendant la période fœtale. Étant donné que l'apport en acides gras influence significativement les taux de β-oxydation dans le myocarde, leur contribution aux besoins énergétiques du cœur fœtal reste limitée (Lopaschuk and Jaswal, 2010).

Le cholestérol, présent dans toutes les cellules du corps humain, aide à maintenir l'intégrité des membranes cellulaires et permet la signalisation intracellulaire. Avec des niveaux relativement stables de cholestérol total dans le liquide amniotique, le cholestérol maternel joue un rôle essentiel dans l'apport nécessaire au développement fœtal. Après l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine, le cholestérol maternel devient essentiel pour poursuivre l'embryogenèse, il traverse les membranes placentaires pour pénétrer dans la circulation fœtale (Lin et al., 1977). Chez l'homme, pendant les huit premières semaines de développement, avant l'établissement de la circulation utéroplacentaire, le sac vitellin secondaire joue un rôle clé dans l'échange de cholestérol entre la mère et le fœtus. Les molécules de la mère s'infiltrent dans la cavité exocœlomique puis sont absorbées par la membrane du sac vitellin secondaire et transportées à travers leurs membranes pour rejoindre la circulation fœtale (Jauniaux and Gulbis, 2000). À environ huit semaines de gestation, le sac vitellin secondaire régresse, et le placenta prend en charge le rôle nutritionnel. À ce stade, deux couches cellulaires, le trophoblaste (qui devient plus tard le syncytiotrophoblaste) et l'endothélium, séparent la circulation fœtale de la circulation maternelle. Le cholestérol est absorbé du côté maternel du trophoblaste via des mécanismes dépendants et indépendants des récepteurs, transporté vers le lysosome où les esters de cholestérol liés aux lipoprotéines sont hydrolysés en cholestérol libre. Ce cholestérol est ensuite transféré à la membrane basolatérale pour rejoindre la circulation fœtale (Jauniaux et Gulbis, 2000). Pendant la grossesse, la concentration de cholestérol total chez la mère augmente de 30 à 50 % en raison d'une synthèse accrue de cholestérol par le foie, un phénomène

qui commence dès le premier trimestre mais atteint son apogée au troisième trimestre (Chiang et al., 1995 ; Amundsen et al., 2006).

Si le fœtus dépend effectivement d'un apport maternel en cholestérol au début de la grossesse, les maladies qui affectent le taux de cholestérol maternel pourraient avoir des effets négatifs sur le développement et la croissance fœtale. Les enfants de femmes qui souffrent d'obésité ou de diabète physiologique semblent en effet présenter un risque accru d'anomalies congénitales (Stothard et al., 2009 ; Persson et al., 2017 ; Persson et al., 2019 ; Turunen et al., 2024)

Le cholestérol est essentiel dans le développement précoce du fœtus en influençant des protéines telles que Sonic Hedgehog. En effet, le cholestérol active Sonic Hedgehog, qui envoient des signaux via la famille des facteurs de transcription GLI, activant ou réprimant ainsi les gènes responsables du développement de divers organes, tels que le tube neural, le cerveau, les membres et le cœur (Wagner et Siddiqui, 2007). De plus, le cholestérol agit sur des récepteurs nucléaires importants comme le facteur de transcription fœtoprotéique NR5A2 impliqué dans les voies de signalisation fondamentales durant l'embryogenèse (Baardman et al., 2013). NR5A2, se lie aux éléments GATA, indispensables au développement de nombreux organes, et est fortement exprimé dans les cellules de la crête neurale (Paré et al., 2004).

Bien que le fœtus produise lui-même la majeure partie de son cholestérol, principalement par le foie, il dépend fortement du cholestérol maternel au cours des premières semaines de vie, lorsque la formation des organes est en cours. Des études récentes montrent que les sous-produits de la synthèse endogène du cholestérol fœtal, tels que le dihydrolanostérol, le lanostérol et le lathostérol, sont faibles dans le liquide amniotique jusqu'à la 19e semaine de grossesse, après quoi leurs niveaux augmentent considérablement (Baardman et al., 2013).

Chapitre III : Métabolisme énergétique et développement cardiaque

A. Le métabolisme énergétique

a. Les Mitochondries

Les mitochondries, apparues il y a environ 2 milliards d'années par l'endocytose de protéobactéries α par des ancêtres de cellules eucaryotes modernes, sont devenues des organites vitaux chez les eucaryotes, avec de nombreuses fonctions. Elles sont entourées d'une double membrane constituée chacune d'une bicouche lipidique et de deux compartiments aqueux. La membrane externe, relativement perméable, agit comme une frontière entre le cytoplasme et les mitochondries, comportant des récepteurs pour la communication inter-organites. La membrane interne, beaucoup moins perméable et plissée en crêtes dans la matrice, héberge les complexes de phosphorylation oxydative (OXPHOS) qui génèrent de l'ATP. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) reste mal défini dans sa configuration biomoléculaire. La matrice mitochondriale, l'espace à l'intérieur de la membrane interne, contient l'ADN mitochondrial (ADNmt), les ribosomes, les enzymes et les ions, ainsi que le cycle de l'acide tricarboxylique (Lotz et al. 2014).

Ce qui rend les mitochondries uniques, c'est qu'elles possèdent leur propre génome autosuffisant. L'ADNmt situé dans la matrice mitochondriale, code 11 sous-unités clés des complexes I, III et IV de la chaîne de transport d'électrons et 2 sous-unités de l'ATP synthase (Chang et al., 2018), ainsi il code 13 composants essentiels de la chaîne de transport d'électrons (ETC) ainsi que tous les ARN ribosomiques et ARN de transfert nécessaires à la traduction des protéines. Cependant, la majorité des protéines mitochondriales (>1000) sont codées par le génome nucléaire. Ainsi, la biogenèse des mitochondries nécessite une coordination précise des génomes mitochondrial et nucléaire, largement régulée par des facteurs issus du génome nucléaire. Tous les mécanismes de contrôle nécessaires à la biogenèse mitochondriale sont donc inclus dans les >1000 protéines mitochondriales du génome nucléaire (Pagliarini et al. 2008).

ix. Généralité et rôle de la mitochondrie

Les mitochondries sont des organites essentiels à la production d'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire. Elles contribuent activement à la synthèse d'ATP à travers des processus tels que le cycle de Krebs (cycle de l'acide tricarboxylique, TCA), la phosphorylation oxydative et la bêta-oxydation. La quantité et la forme des mitochondries varient selon le type et le rôle des cellules, les muscles squelettiques en contenant une quantité variable. Elles peuvent adopter différentes formes, sphériques, fusiformes ou ramifiées, avec des dimensions typiques d'environ 1 à 2 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large. La mitochondrie a trois compartiments : le cytoplasme, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (**Figure 19**). La membrane interne forme des invaginations appelées crêtes mitochondriales, qui augmentent considérablement la surface membranaire et les capacités respiratoires mitochondriales, la densité des crêtes est en corrélation avec les besoins énergétiques cellulaires (Zhao et al., 2019). La matrice mitochondriale abrite diverses enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, la biosynthèse, la défense antioxydante et la synthèse protéique. Elle remplit également d'autres fonctions telles que la régulation du pH cellulaire, la synthèse des hormones stéroïdes, la thermogénèse et l'initiation de processus de mort cellulaire programmée via le cytochrome c.

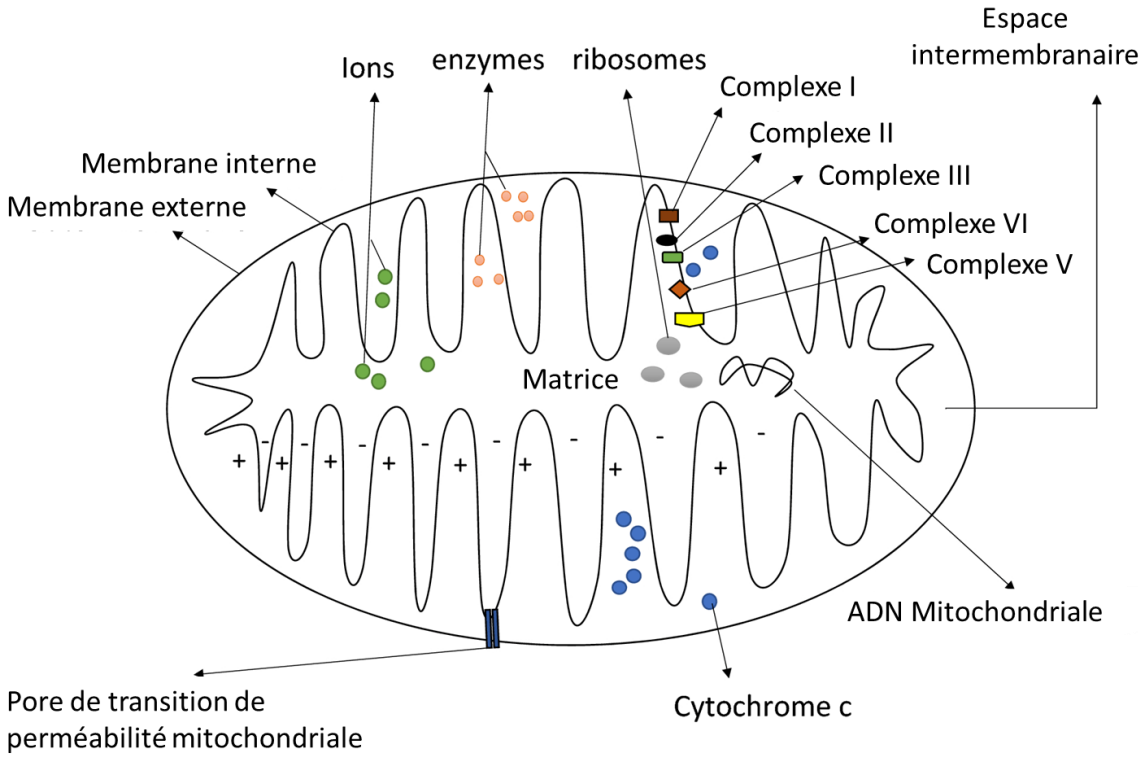


Figure 19 : Structure mitochondriale.

On distingue la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie, séparées par l'espace intermembranaire. Dans la matrice mitochondriale, on retrouve des ions, des enzymes, et des ribosomes, ainsi que l'ADN mitochondrial. Les complexes de la chaîne respiratoire (complexe I, II, III, IV et V) sont intégrés dans la membrane interne, permettant le transfert des électrons et le pompage des protons nécessaires à la synthèse d'ATP. Le cytochrome c, situé dans l'espace intermembranaire, intervient dans le transport des électrons entre les complexes III et IV. Le pore de transition de perméabilité mitochondriale est également indiqué, participant à la régulation de la perméabilité de la membrane interne (Zhao et al., 2019).

La membrane externe mitochondriale est caractérisée par la présence de porines, des protéines qui forment des canaux aqueux, permettant le passage de molécules de petite taille telles que l'ATP, l'ADP, et divers ions et substrats (Rothfield, 2014). Cette structure, composée d'une bicouche lipidique et d'environ 60% de protéines et 40% de lipides, est également dotée de diverses enzymes et récepteurs protéiques (Saks, 2007; Timohhina, 2009; Perry, 2012). Les porines, également connues sous le nom de « Voltage-dépendent anion channels », facilitent les échanges entre le cytosol et l'espace intermembranaire mitochondrial, jouant ainsi un rôle crucial dans le transport de métabolites (Saks, 2007; Timohhina, 2009; Perry, 2012).

En revanche, la membrane interne mitochondriale, bien que formée de crêtes dirigées vers l'intérieur de la mitochondrie, présente une perméabilité réduite par rapport à la membrane externe en raison de sa densité élevée en protéines membranaires. Cette membrane, principalement composée de protéines (70 à 80%), abrite des complexes protéiques et des transporteurs, nécessitant souvent l'utilisation de transporteurs transmembranaires pour le passage des molécules et des ions vers la matrice mitochondriale (Saks, 2007; Timohhina, 2009; Perry, 2012). En outre, le transporteur adenine nucleotide translocator présent dans cette membrane facilite le transfert d'ATP de la matrice vers l'espace intermembranaire, ainsi que le passage d'ADP dans le sens inverse (Saks, 2007; Timohhina, 2009; Perry, 2012).

x. Dynamique mitochondriale

Le rôle central des mitochondries dans la contractilité cardiaque repose sur leur capacité à s'adapter et à réguler leur structure et leur fonction en réponse à divers stimuli environnementaux, tels que l'exercice physique, la restriction calorique et le stress oxydatif. Cette adaptabilité est principalement orchestrée par la dynamique du réseau mitochondrial et la biogenèse mitochondriale, qui régulent la croissance, l'organisation et la synthèse des constituants mitochondriaux.

La dynamique du réseau mitochondrial, contrôlée par des processus de fusion et de fission, joue un rôle dans l'adaptation mitochondriale. Par exemple, la fission est régulée par la dynamin-related protein 1 (DRP1) et son récepteur fission-mediator protein 1 (FIS1). La fission mitochondriale joue un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires de base, y compris la division cellulaire pour fournir aux cellules suffisamment de mitochondries tandis que la fusion est médiée par les mitofusines (MFN1 et MFN2) et l'optic atrophic type 1 protein (OPA1) (Quiles et al., 2022 ; Mattie et al., 2018). Ainsi, la fission mitochondriale est nécessaire à l'homéostasie cellulaire et ce processus est souvent activé de manière aberrante dans les maladies cardiovasculaires.

PGC-1 agit comme un régulateur central de la biogenèse mitochondriale en interagissant avec plusieurs facteurs de transcription nucléaires, notamment les *PPAR*s, les estrogen-related receptors (ERRs) et les nuclear respiratory factors (NRFs), induisant ainsi l'expression coordonnée de gènes impliqués dans la stimulation de la biogenèse mitochondriale (Lin et al., 2002; Puigserver & Spiegelman, 2003; Ventura-Clapier et al., 2008 ; Yu et al., 2020). En activant la transcription et la réplication de l'ADNmt, PGC-1 favorise la synthèse de nouveaux composants mitochondriaux nécessaires à l'adaptation et à la régulation des fonctions mitochondriales (Wang et al., 2010).

En outre, les principaux régulateurs de la ß-oxydation des acides gras, tels que *PPAR* et ERR, participent à la modulation des fonctions mitochondriales en augmentant l'expression des enzymes impliquées dans ce processus (Barger & Kelly, 2000). *PPAR*, en particulier, joue un rôle essentiel dans la protection mitochondriale et la biogenèse (Wang et al., 2010). L'ERR α, quant à lui, régule une partie des cibles de *PPAR* impliquées dans plusieurs voies de production d'énergie, telles que le transport et l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie et le péroxysome, ainsi que la respiration

mitochondriale. La juxtaposition de mitochondries et de gouttelettes lipidiques a été décrite dans les tissus adipeux et musculaires squelettiques, et il a été démontré qu'elle était médiée par la périlipine 5 (Plin5), qui réside à la surface des gouttelettes lipidiques. Les mitochondries associées aux gouttelettes lipidiques (également connues sous le nom de mitochondries péridroplétiques) présentent des propriétés uniques, notamment une capacité bioénergétique accrue, une ß-oxydation plus faible et des cycles de fission-fusion plus lents (Wang et al., 2011 ; Benador et al., 2018 ; Giacomello et al., 2020). Il semble donc que l'interaction avec les gouttelettes lipidiques ait un effet inhibiteur sur la dynamique mitochondriale, peut-être en influençant directement la machinerie de fusion-fission, ou en exposant ses acteurs principaux à un flux constant d'acides gras ou de leurs dérivés qui pourraient les inhiber.

b. Les voies métaboliques essentielles.

Les réactions glycolytiques (du glucose au pyruvate), le cycle de Krebs et la respiration mitochondriale (OXPHOS) constituent les voies métaboliques essentielles pour la production de l'énergie cellulaire (**Figure 20**).

Dans le cœur adulte, la demande énergétique est extrêmement élevée, nécessitant une production continue d'ATP (L'adénosine-triphosphate) pour soutenir sa fonction contractile (Lopaschuk et al., 2010 ; Karwi et al., 2018). Cette production d'ATP provient principalement de deux sources : la phosphorylation oxydative mitochondriale et la glycolyse. Normalement, la phosphorylation oxydative mitochondriale répond à environ 95% des besoins en ATP du myocarde, tandis que la glycolyse contribue aux 5% restants (Saddik and Lopaschuk, 1991 ; Wisneski et al., 1990). Les principaux carburants utilisés par le cœur comprennent les acides gras, le lactate, le glucose, les cétones et les acides aminés, qui doivent être continuellement fournis par le sang, car le cœur a une capacité limitée à stocker ces substrats énergétiques à l'intérieur des cellules. Environ 40 à 60% de la production mitochondriale d'ATP provient de l'oxydation des acides gras, tandis que le reste provient de l'oxydation du pyruvate (issu du glucose et du lactate), des corps cétoniques et des acides aminés. Bien que la majorité de l'oxygène consommé par le cœur soit utilisée pour la phosphorylation oxydative mitochondriale par la chaîne de transport d'électrons, la synthèse d'ATP dérivée de la glycolyse ne nécessite pas d'oxygène. Toute

perturbation des voies métaboliques énergétiques produisant de l'ATP ou de l'apport d'oxygène au cœur peut avoir des conséquences graves sur sa fonction. (Lopaschuk et al., 2010; Neubauer, 2007).

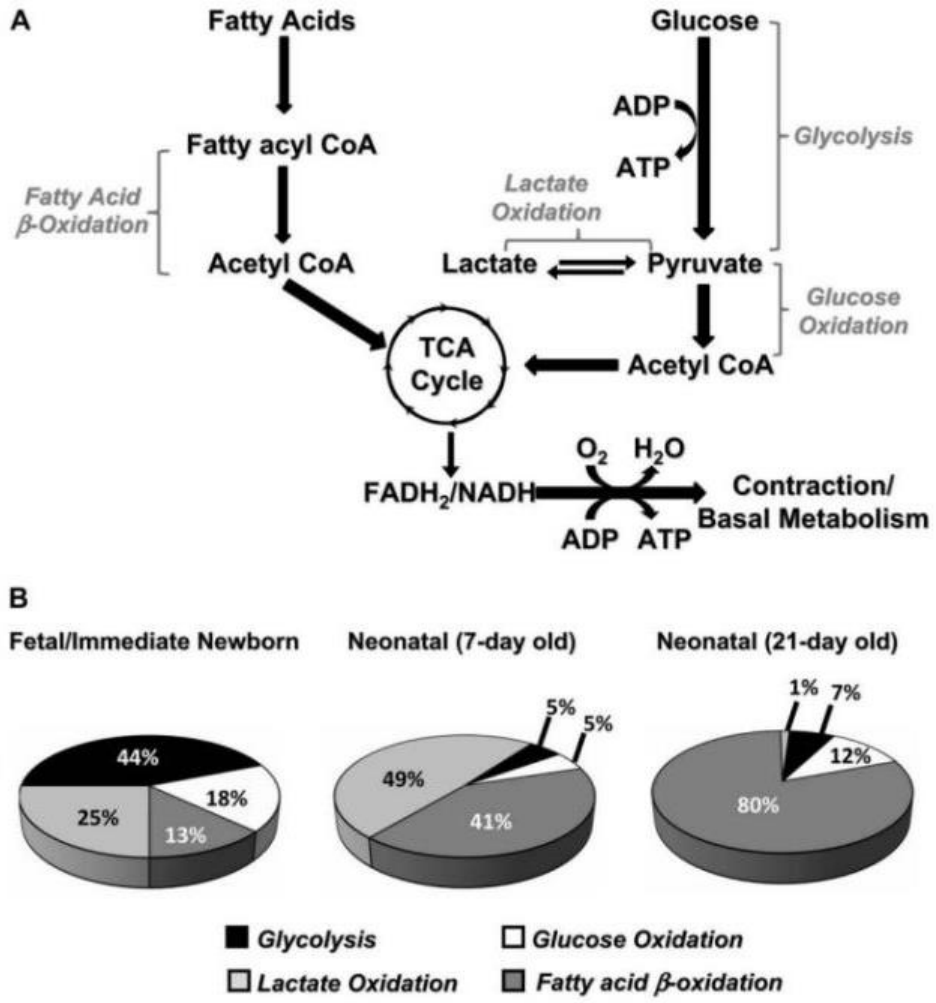


Figure 20 : Vue d'ensemble des différentes voies métaboliques contribuant à la production d'ATP dans les cardiomyocytes.

A) Le catabolisme du glucose via la glycolyse génère 2 mol d'ATP par mol de glucose, tandis que l'oxydation complète du glucose (incluant la glycolyse et l'oxydation ultérieure du pyruvate) produit 31 mol d'ATP par mol de glucose. L'oxydation du lactate (conversion en pyruvate suivie de son oxydation) génère 15 mol d'ATP par mol de lactate, et l'oxydation des acides gras (comme le palmitate) produit 105 mol d'ATP par mol de palmitate. B) Le pourcentage de contribution de la glycolyse et du métabolisme oxydatif, y compris l'oxydation du glucose, du lactate et des acides gras, à la production d'ATP cardiaque est illustré pour les périodes néonatale et fœtale immédiates, ainsi que pour la

période néonatale (de 7 à 21 jours), dans un modèle de cœur de lapin isolé (Lopaschuk and Jaswal, 2010).

xi. Glyoclyse et production d'ATP.

Le glucose qui est utilisé par la glycolyse pénètre dans les cellules grâce à des transporteurs spécifiques car sa nature hydrophobe le rend imperméable à la double membrane plasmique. Deux types de transporteurs de glucose sont présents dans les cardiomyocytes : les GLUTs (GLUcose Transporter, transporteurs facilitants) et les SGLTs (cotransporteurs sodium-glucose) (Wood et al., 2004). Dans le cœur adulte, les GLUTs sont les transporteurs prédominants dans le cœur, appartenant à une superfamille comprenant 14 membres chez les mammifères.

La glycolyse se déroule dans le cytoplasme des cellules et transforme le glucose en pyruvate. Ce processus s'effectue en plusieurs étapes. Initialement, le glucose est phosphorylé pour former du glucose-6-phosphate, nécessitant la consommation d'une molécule d'ATP. Ensuite, le glucose-6-phosphate est isomérisé en fructose-6-phosphate, suivi d'une autre phosphorylation pour générer du fructose-1,6-bisphosphate, demandant une seconde molécule d'ATP. Le fructose-1,6-bisphosphate est ensuite scindé en deux molécules de trois carbones chacune : le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le glyceraldehyde-3-phosphate (G3P). Le DHAP est converti en une seconde molécule de G3P, produisant ainsi deux molécules de G3P. Ces molécules de G3P subissent ensuite une série de réactions qui aboutissent à la formation de pyruvate. Tout au long de la glycolyse, des molécules de NADH sont produites à partir de NAD^+, jouant un rôle crucial dans la production d'ATP. Finalement, pour chaque molécule de glucose décomposée, deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH sont produites (Figure 21).

xii. Le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA, cycle de Krebs).

Parallèlement, le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) produit également des électrons à partir du FADH2, via l'action de la succinate déshydrogénase, qui fait partie à la fois du

cycle TCA et du complexe II de l'ETC. Le cycle de l'acide tricarboxylique , aussi appelé cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique, est une série de réactions biochimiques essentielles qui fonctionne comme un moteur métabolique dans les cellules. Ce cycle est un carrefour métabolique clé, intégrant divers substrats issus de l'oxydation du pyruvate, des acides gras et des acides aminés. Il débute par la condensation de l'acétyl-CoA (à deux carbones) avec l'oxaloacétate (à quatre carbones) pour former du citrate, une molécule à six carbones. Ensuite, le citrate se transforme en isocitrate, puis subit deux décarboxylations successives : d'abord en α-cétoglutarate à cinq carbones, puis en succinyl-CoA à quatre carbones. Ces réactions libèrent deux molécules de CO_2 et produisent du NADH. Le succinyl-CoA se convertit ensuite en succinate, produisant du GTP, qui peut être transformé en ATP, l'énergie utilisable par la cellule. Le succinate est ensuite oxydé en fumarate, une étape où des électrons sont transférés à la FAD pour former $FADH_2$. Cette étape est catalysée par la succinate déshydrogénase, une enzyme également intégrée dans la chaîne de transport d'électrons. Finalement, le fumarate est converti en malate, puis en oxaloacétate, prêt à initier un nouveau cycle en réagissant avec une nouvelle molécule d'acétyl-CoA. Ce cycle produit des intermédiaires clés et de l'énergie nécessaire pour la cellule.

xiii. Phosphorylation oxydative (OXPHOS) et respiration mitochondriale.

L'adénosine-triphosphate (ATP) est le substrat ultime utilisé par la plupart des enzymes pour convertir l'énergie stockée chimiquement en changements conformationnels et finalement en mouvement mécanique. Le cœur a un besoin vorace d'énergie – en effet, le cœur humain cycle environ 6 kg d'ATP par jour (Neubauer, 2007). La majorité de cet ATP est générée dans les mitochondries au niveau de la chaîne respiratoire par phosphorylation oxydative (**Figure 21**). Contrairement à une idée reçue, les complexes de l'ETC sont en réalité des structures multi-protéiques.

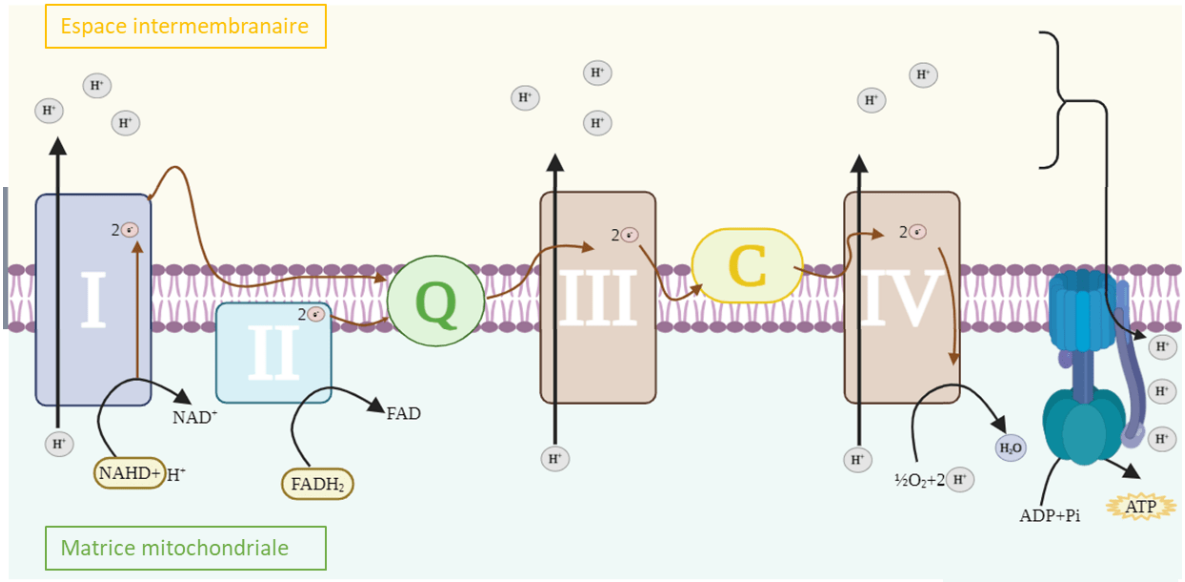


Figure 21 : Chaîne respiratoire mitochondriale et phosphorylation oxydative.

La chaîne respiratoire correspond à une chaîne de complexes protéiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie et responsables de la production d'ATP à partir du NADH et du $FADH_2$ produits lors des différentes voies cataboliques de l'organisme. Cette production d'énergie est permise grâce à la formation d'un gradient électrochimique de protons dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, lui-même formé par l'énergie des électrons provenant du NADH et du $FADH_2$. Les électrons riches en énergie récupérés seront transportés successivement via les différents complexes :

Le complexe I a une action NADH coenzyme Q réductase, récupérant les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.

Le complexe II a une action Succinate coenzyme Q réductase, et permet le transport d'aucun proton.

Le complexe III a une action Coenzyme Q cytochrome C réductase, et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.

Le complexe IV a une action Cytochrome C réductase, et permet le transport de 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.

Le coenzyme Q (ou ubiquinone) permet le transport entre le complexe I et le complexe III.

Le cytochrome C permet le transport entre le complexe III et le complexe IV.

Suite à la chaîne de complexe protéique, le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène, qui sera ainsi à l'origine de la formation de molécule d'eau. Le NADH permettra donc le transport de 10 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire, tandis que le $FADH_2$, également issu de la chaîne de complexes, permettra le transport de 6 protons, ce qui formera un gradient de protons que l'on appelle également l'ATP-synthétase, et qui sera à l'origine de la formation d'ATP (Figure issue de biorender).

Quatre complexes de chaînes respiratoires coopèrent dans le transfert d'électrons dérivés de diverses voies métaboliques vers l'oxygène moléculaire, établissant ainsi un gradient électrochimique sur la membrane mitochondriale interne qui alimente la synthèse de l'ATP. Ce transport d'électrons repose sur des porteurs d'électrons mobiles qui relient fonctionnellement les complexes. Bien que les complexes individuels puissent fonctionner indépendamment, ils sont *organisés in situ* en grands assemblages appelés super-complexes respiratoires. Les réactions biochimiques, dont beaucoup se produisent dans le cytoplasme, convertissent les glucides et les lipides en acétyl-CoA mitochondrial. Ce métabolite central est traité dans la matrice mitochondriale par le cycle de l'acide tricarboxylique. Les électrons provenant de ces réactions de TCA sont transmis aux quatre complexes multiprotéiques (CI-CIV) de la chaîne de transport d'électrons. Dans un processus appelé phosphorylation oxydative, les électrons sont transportés à travers la chaine de transport l'électron, où ils réduisent finalement l'oxygène moléculaire pour former de l'eau.

La chaîne respiratoire génère également des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans des conditions physiologiques, les ROS jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire, mais dans les états pathologiques, une production excessive de ROS peut devenir préjudiciable aux cardiomyocytes. En effet, les mitochondries sont la principale source de ROS dans les cellules. Ce superoxyde est produit lors de la respiration cellulaire au niveau de la chaîne de transport d'électrons, notamment aux complexes I (NADH déshydrogénase) et III (ubiquinol-cytochrome c réductase) (Kampjut and Sazanov, 2020 ; Stephan and Ott 2020 ; Osyczka et al., 2005). À des niveaux modérés, les ROS agissent comme des molécules de signalisation, régulant divers processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose, et la réponse au stress. Lorsque la production de ROS dépasse la capacité des systèmes antioxydants à les neutraliser, cela conduit à un stress oxydatif. Les ROS peuvent endommager les lipides, les protéines et l'ADN mitochondrial, compromettant la fonction mitochondriale et entraînant des dysfonctionnements cellulaires (Zorov et al., 2014).

xiv. Oxydation des acides gras dans la production d'énergie

La β-oxydation mitochondriale des acides gras (β-OAG) joue également un rôle crucial dans la production d'ATP au sein de divers organes, en s'adaptant aux besoins spécifiques de chaque type cellulaire (**Figure 20**). Elle constitue la principale voie d'utilisation énergétique des acides gras, capable de métaboliser une large gamme de substrats. Ce processus, essentiellement localisé dans les mitochondries, est la principale source d'énergie pour certains tissus, comme le cœur, où il peut représenter jusqu'à 95% de l'énergie totale produite. Cette proportion élevée se retrouve également dans de nombreux autres tissus et organes (Lopaschuk et al., 2010).

Lorsqu'ils pénètrent dans les cardiomyocytes, les acides gras subissent une série de transformations enzymatiques. Ils sont d'abord estérifiés en acyl-CoA gras, puis ils sont convertis en acylcarnitine à longue chaîne par la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT-1) qui est ensuite transportée dans les mitochondries, où le groupe acyle est réattelé au CoA pour reformer l'acyl-CoA gras. L'acyl-CoA est alors soumis à la β-oxydation, produisant de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique, ainsi que du FADH2 et du NADH, qui alimentent la chaîne de transport des électrons pour générer de l'ATP (Paulson et al., 1984). Le cycle de l'acide tricarboxylique produit également du NADH et du FADH2, qui alimentent la chaîne de transport des électrons.

La régulation de l'oxydation des acides gras se fait par divers mécanismes, tels que la disponibilité et l'absorption des acides gras, l'inhibition de la CPT-1 par le malonyl-CoA, les rapports DCP/FADH2 et NAD/NADH, le ratio acétyl-CoA/CoA mitochondrial, les modifications post-traductionnelles des enzymes impliquées, et la régulation transcriptionnelle de leur expression.

Cette régulation de l'oxydation des acides gras est cruciale pour la flexibilité métabolique du cœur, lui permettant de s'adapter aux variations des substrats disponibles (Lopaschuk et al., 2010). Bien que les acides gras produisent un rendement élevé en ATP, ils nécessitent également une quantité significative d'oxygène pour produire cet ATP, les rendant ainsi moins efficaces que d'autres substrats en termes de production d'énergie par unité d'oxygène consommé.

B. Le métabolisme énergétique chez l'embryon et dans le développement du cœur embryonnaire

c. Maturation des mitochondries cardiaques dans les embryons

Le processus de maturation mitochondriale à différents stades du développement cardiaque chez les mammifères reste en grande partie méconnu, notamment en ce qui concerne les mitochondries dans les cellules précurseurs cardiaques (Zhao et al., 2019). Les dernières études ont décrit qu'entre les jours embryonnaires E6,5 et E8,5 chez la souris, l'ensemble de l'embryon est exposé à des conditions de faible teneur en oxygène, où la glycolyse aérobie semble être la principale source d'ATP pour les cellules précurseurs cardiaques (Ufer and Wang, 2011 ; Porter et al., 2011). À environ E8,5 chez la souris, certaines mitochondries peuvent être observées dans les cardiomyocytes, bien que ces mitochondries soient considérées comme "très immatures", (Mackler et al., 1971 ; Hom et al., 2011 ; Dorn et al., 2015) avec peu de crêtes et pas de matrice élargie. L'augmentation du nombre de mitochondries dans les cardiomyocytes et l'observation de crêtes se produisent vers E9,5 chez la souris. À ce stade, la plupart des mitochondries sont encore de "classe 1" (**Figure 22**). À E10,5 chez la souris et, les crêtes dans les mitochondries cardiaques augmentent, certaines mitochondries présentant des crêtes tubulaires et une matrice légèrement dilatée, caractéristiques des mitochondries "immatures" (classe 2) (Mackler et al., 1971 ; Hom et al., 2011 ; Dorn et al., 2015). Les résultats qui ont été décrits jusqu'à présente démontrent que malgré la présence de complexes de la chaîne respiratoire dans la membrane interne, l'activité de l'ETC et la production d'ATP ne sont pas couplées dans les mitochondries des classes 1 et 2 (Mackler et al., 1971 ; Hom et al., 2011 ; Dorn et al., 2015).

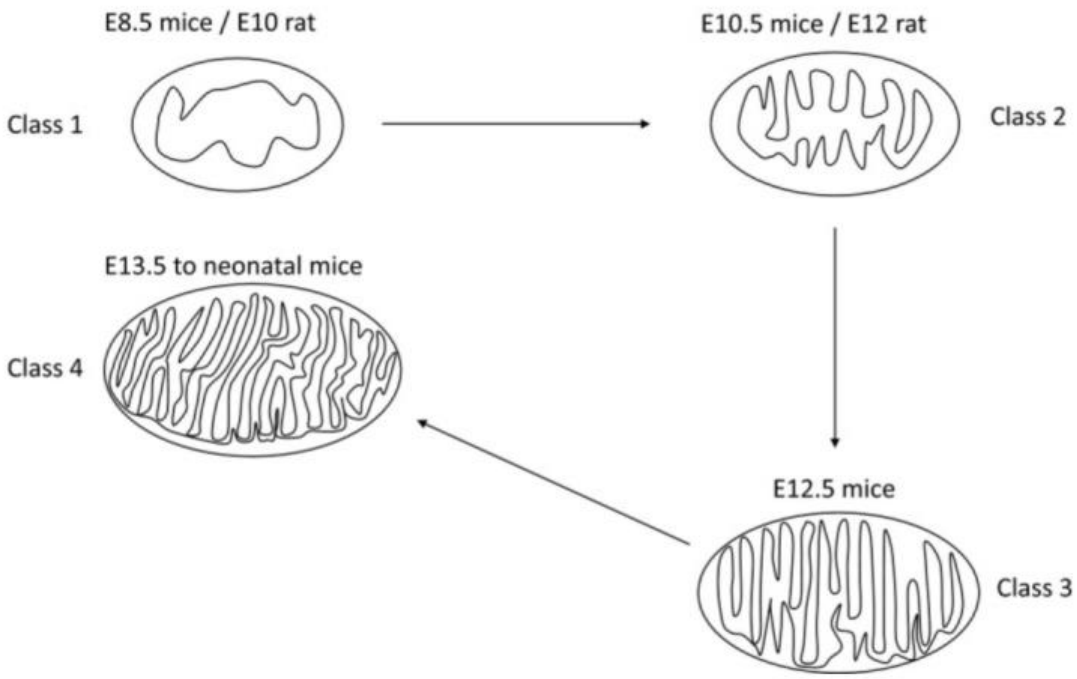


Figure 22 : Maturation mitochondriale.

Maturation des mitochondries selon les jours embryonnaires E8.5 à E12.5. A E8.5 chez les souris les mitochondries sont considérées comme « très immatures » (classe 1). Ils contiennent peu de crêtes et aucune matrice élargie. À E10,5 chez la souris le nombre de crêtes dans les mitochondries cardiaques avec des crêtes tubulaires, qui forment des connexions à la périphérie. La matrice de ces mitochondries est légèrement élargie et est considéré comme « immature » (classe 2). A E12.5 la plupart des mitochondries cardiaques deviennent « presque matures » (classe 3) contenant de nombreuses crêtes tubulaires qui sont reliées à la périphérie. Leurs matrices sont très compactées, plus de respirasomes peuvent être observés sur les membranes internes des mitochondries. À E13.5, les mitochondries sont fonctionnellement matures (Zhao et al., 2019).

Vers E11,5 chez la souris, les complexes OXPHOS commencent à s'assembler en respirasomes très efficaces, permettant le couplage de l'activité de l'ETC et la production d'ATP. Aux stades correspondant à E12,5 et E13,5 chez la souris, la plupart des mitochondries cardiaques deviennent "presque matures" (classe 3), avec des structures rappelant les mitochondries matures (classe 4) observées les tissus cardiaques postnatals et adultes. Ces mitochondries de classe 3 présentent de nombreuses crêtes tubulaires reliées à la périphérie et une matrice compacte. À E13,5, les mitochondries sont considérées comme fonctionnellement matures, avec leurs pores de transition de perméabilité mitochondriale fermés. Leur activité OXPHOS est indiscernable de celle des

mitochondries adultes, (Mackler et al., 1971 ; Hom et al., 2011) marquant le moment où les cardiomyocytes acquièrent de l'ATP à la fois par glycolyse anaérobie et par OXPHOS (Lopaschuk and Jaswal, 2010). Vers la fin de la gestation, environ 44% de l'ATP total est généré par la glycolyse anaérobie dans les cœurs prénataux et nouveau-nés, avec le reste reposant sur l'OXPHOS (Lopaschuk and Jaswal, 2010). Ce passage métabolique de la glycolyse anaérobie au métabolisme aérobie survient au cours de la mi-à-fin de la gestation dans le cœur des mammifères, avec plus de 50% de l'ATP produit par OXPHOS vers la fin de la gestation dans les cœurs prénataux (Lopaschuk and Jaswal, 2010).

d. Interactions entre les mitochondries et le développement cardiaque

Le cœur du fœtus, se développant dans un environnement à faible teneur en oxygène, dépend principalement de la glycolyse pour produire de l'ATP, avec une contribution minoritaire (moins de 15 %) de la β–oxydation des acides gras à la production énergétique totale par le myocarde. Cette préférence métabolique s'explique en partie par la disponibilité des substrats énergétiques. Les espèces réactives de l'oxygène sont des produits physiologiques du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Leur production peut augmenter ou devenir incontrôlée en cas de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (Pohjoismäki et al., 2017). Des recherches récentes ont révélé que les ROS agissent également comme des molécules de signalisation. Les niveaux de ROS restent élevés dans les cardiomyocytes de souris à l'embryon E9.5 et diminuent avec le développement embryonnaire (Hom et al., 2011). Outre leur rôle dans la régulation de la différenciation et de la maturation des cardiomyocytes, les ROS peuvent également influencer leur prolifération (Luo et al., 2019). Pris ensemble, les ROS jouent un rôle complexe au cours de la cardiogenèse, et leurs effets dépendent du stade de développement. Une augmentation des niveaux de ROS favorise la différenciation des cardiomyocytes à partir des cellules précurseurs. À des stades ultérieurs, une réduction des ROS, par la fermeture des pores de transition de perméabilité mitochondriale, est

nécessaire pour la maturation normale des cardiomyocytes. Cependant, des niveaux élevés de ROS résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial dans les cœurs embryonnaires peuvent conduire à une cardiomyopathie congénitale sévère en déclenchant la voie des dommages à l'ADN et en entravant ainsi la prolifération des cardiomyocytes (**Figure 23**).

Les mitochondries jouent un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose cellulaire, un processus de mort cellulaire programmée distinct de la nécrose. L'apoptose est essentiel au développement embryonnaire. Les protéines proapoptotiques BAX et BAK sont activées par des signaux de mort cellulaire, s'associant à la membrane externe mitochondriale pour former des pores. Cela altère le potentiel membranaire externe et permet la libération de cytochrome c dans le cytosol. Le cytochrome c interagit ensuite avec les facteurs d'activation de la protéase apoptotique 1 pour former l'apoptosome, qui active la cascade de caspases, conduisant à la mort cellulaire. En plus du cytochrome c, les mitochondries peuvent libérer du SMAC pour activer les caspases. (Wang And Youle, 2016).

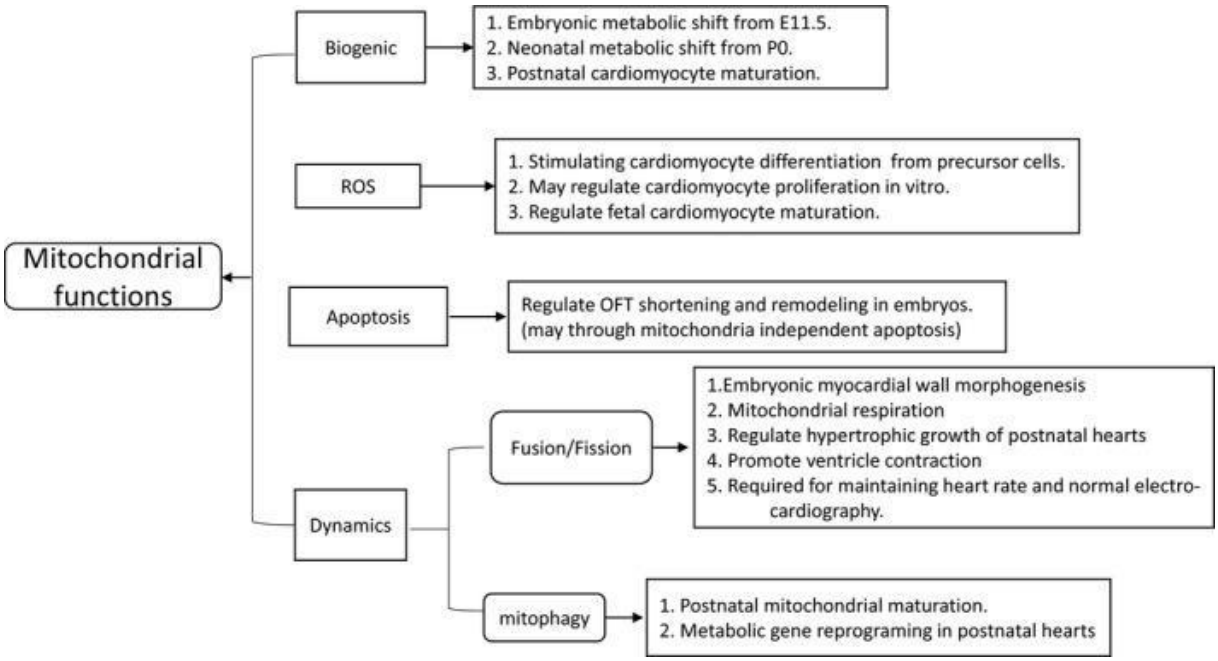


Figure 23 : Évolution des fonctions mitochondriales pendant la cardiogenèse.

Cette figure illustre l'évolution des différentes fonctions mitochondriales au cours de la cardiogenèse, détaillant les principaux aspects du développement cardiaque à divers

stades. E jour embryonnaire ; OFT la voie d'écoulement ; P, jour postnatal ; ROS espèces réactives de l'oxygène (Zhao et al., 2019).

Au cours du développement cardiaque, l'apoptose joue un rôle crucial dans le raccourcissement et le remodelage de l'OFT. Des études sur des embryons de poulet ont montré que le raccourcissement et la rotation de l'OFT sont dus à l'apoptose des cardiomyocytes dans la région proximale de l'OFT (Watanabe et al., 1998). Des observations similaires ont été faites dans les cœurs embryonnaires de souris, où l'apoptose dans la région proximale de l'OFT initialement à E12.5, culmine à E13.5 à E14.5 et diminue par la suite, ce qui est corrélée avec le raccourcissement de la période de l'OFT. (Watanabe et al., 2001) Outre la région de l'OFT, l'apoptose peut également être observée dans le ventricule et les cellules endocardiques, suggérant son implication dans la morphogenèse ventriculaire. Bien que le rôle des mitochondries dans l'apoptose soit bien établi, d'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes précis impliqués dans l'apoptose pendant le remodelage de l'OFT. Ces recherches pourraient révéler le signal déclencheur de la mort cellulaire dans l'OFT et clarifier quelle voie apoptotique est utilisée pour réguler ce processus de remodelage (Zhao et al., 2019).

Il a été démontré que l'activation mitochondriale soutient la prolifération et la différenciation des cellules souches en fournissant de l'énergie et des métabolites agissant comme molécules de signalisation. Un stress mitochondrial concomitant peut entraîner une perte de l'auto-renouvellement des cellules souches et nécessite la surveillance de divers mécanismes de contrôle de la qualité mitochondriale. De plus, il a été démontré que la forme tronquée de *PPARγ2* est principalement localisée dans la matrice mitochondriale et régule la transcription de l'ADN mitochondrial. L'étude montre que *PPARγ* est localisé dans les mitochondries des cellules humaines (Bourges et al., 2004). Les données suggèrent que *PPARγ2* mitochondrial affecte la respiration mitochondriale en influençant l'expression des gènes de la chaîne de transport d'électrons codés par l'ADN mitochondrial dans les adipocytes bruns. De nombreuses sous-unités de la chaîne de transport d'électrons codées par l'ADN nucléaire s'assemblent en sous-complexes dans la matrice mitochondriale, et leur redistribution à la membrane mitochondriale interne est accélérée par les sous-unités codées par l'ADN mitochondrial (Bourges et al., 2004). Ces données indiquent donc un lien certain entre *Pparγ* et la fonction mitochondriale.

Chapitre IV : Les péroxysomes : Structure, Fonction et Rôle dans le développement embryonnaire

A. Présentation de la famille PPAR

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (*PPAR*) sont des récepteurs nucléaires agissant comme facteurs de transcription activés par des ligands. Ils se présentent en trois isoformes : *PPARα, PPARβ/δ*, et *PPARγ*. Les lipides servent de ligands endogènes pour tous les *PPAR,* les reliant ainsi au métabolisme. Ils forment des hétérodimères avec le récepteur rétinoïde X et en se liant à des ligands, se fixent à des éléments de réponse spécifiques de l'ADN appelés éléments de réponse du proliférateur de peroxysomes (PPRE) (Berger and Moller 2002). Ils modulent alors l'expression génique en fonction des co-répresseurs ou co-activateurs présents, influençant la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (**Figure 24**) (Zhao et al., 2023).

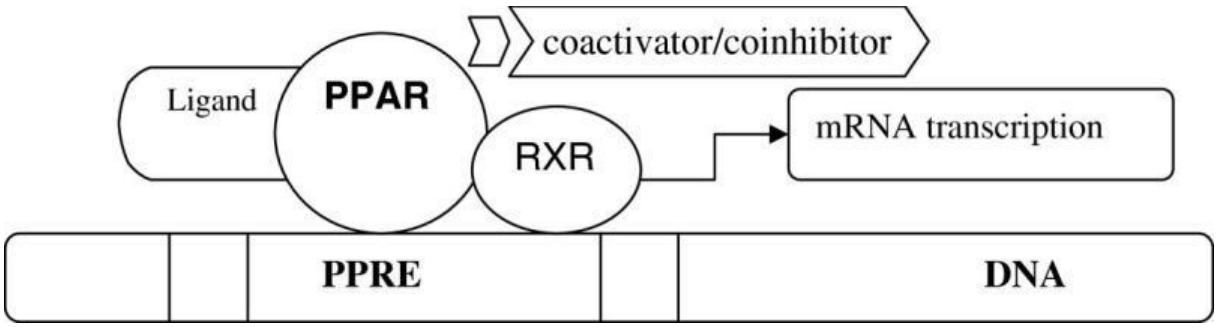


Figure 24 : Mécanisme de transcription des gènes par les PPAR.

Le récepteur PPAR, activé par la liaison avec un ligand, forme un hétérodimère avec le récepteur RXR. Cet ensemble se fixe sur l'élément de réponse PPRE (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element) situé sur l'ADN. L'interaction avec des coactivateurs ou des co-inhibiteurs influence la transcription de l'ARNm, régulant ainsi l'expression des gènes cibles (Grygiel-Górniak, 2014).

Les *PPAR* sont impliqués dans divers troubles métaboliques et représentent des cibles thérapeutiques importantes. Cette famille comprend trois membres principaux *: PPARγ, PPARα* et *PPARβ/δ*, chacun ayant une distribution tissulaire, une spécificité de ligand et des fonctions physiologiques distinctes. *PPARα* régule l'homéostasie énergétique, l'activation de *PPARγ* provoque une sensibilisation à l'insuline et améliore le métabolisme du glucose, il est impliqué dans la régulation de la

différenciation adipocytaire, la modulation de l'inflammation et la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. L'activation de *PPARβ/δ* améliore le métabolisme des acides gras. Ainsi, la famille des récepteurs nucléaires *PPAR* joue un rôle régulateur majeur dans l'homéostasie énergétique et la fonction métabolique (**Figure 25**).

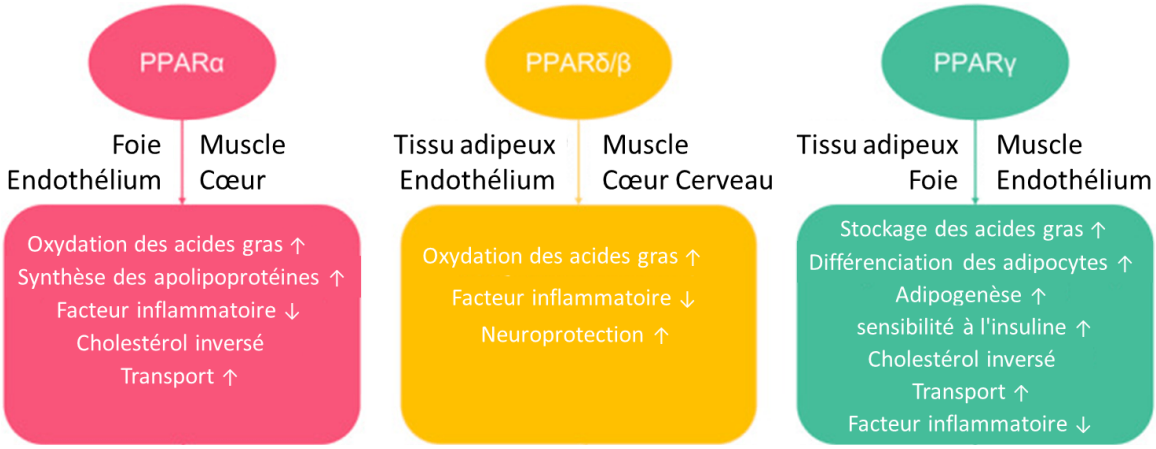


Figure 25 : Distribution et fonction de trois types de *PPARs*.

Cette figure montre les rôles et les localisations tissulaires des trois isoformes de récepteurs *PPARs*. (Zhao et al., 2023)

PPARα, largement exprimé dans les tissus métaboliquement actifs tels que le foie, le cœur et les muscles squelettiques, joue un rôle crucial dans la régulation de la β-OA, favorisant ainsi la combustion des lipides pour la production d'énergie (Zhao et al., 2023). Ses ligands, tels que les fibrates, activent *PPARα* pour stimuler l'expression des gènes impliqués dans la dégradation des acides gras. En revanche, *PPARγ* est principalement présent dans les tissus adipeux et est essentiel dans la différenciation des adipocytes et la régulation de l'insulino sensibilité, favorisant le stockage des lipides et la sensibilité à l'insuline. Les thiazolidinediones, des agonistes synthétiques de *PPARγ*, sont largement utilisés dans le traitement du diabète de type 2 en augmentant l'efficacité de l'insuline. Enfin, *PPARβ/δ*, exprimé de manière ubiquitaire mais abondamment dans les tissus impliqués dans le métabolisme lipidique, régule à la fois la lipogenèse et la β-oxydation des acides gras, favorisant ainsi l'équilibre lipidique et la prévention de l'obésité. Les ligands spécifiques activant *PPARβ/δ* stimulent ces processus métaboliques pour maintenir la fonction métabolique globale.

Les PPAR sont des régulateurs clés de la différenciation cellulaire et des processus métaboliques, en particulier de l'homéostasie des lipides et du glucose. Au niveau moléculaire, les PPAR sont des récepteurs nucléaires activés par des ligands de la superfamille des récepteurs stéroïdiens (Berger and Moller 2002). Après liaison à des ligands spécifiques, ces récepteurs sont transloqués vers le noyau cellulaire, où ils modifient leur conformation et régulent la transcription des gènes cibles (Rogue et al., 2010). Bien que l'expression forcée de *PPARγ* ne soit pas suffisante pour induire l'adipogenèse in vivo, elle peut conduire à la transdifférenciation de cellules musculaires en adipocytes in vitro (Rosen et al., 1999).

B. *PPARγ* dans la différenciation des adipocytes et l'obésité

Au cours du développement cardiaque, il a été démontré que l'activité de *PPARγ* était nécessaire à la formation du tissu adipeux épicardique (Yamaguchi et al., 2015). Ce tissu, composé d'adipocytes ainsi que de cellules immunitaires, endothéliales et vasculaires, exerce une influence significative sur les fonctions hépatiques, vasculaires et cardiaques en sécrétant diverses substances, notamment des adipokines, des microparticules et des lipides. La distribution, la qualité et l'expansion du tissu adipeux régulent son activité biologique. Le tissu adipeux épicardique (la couche mésothéliale externe du cœur), situé sous l'épicarde du cœur, est appelé EAT (Epicardial Adipose Tissue). Sa présence chez l'homme dès les stades fœtaux et chez d'autres espèces suggère qu'il est sous contrôle génétique du développement (Marchington et al 1989). Chez les rongeurs, l'EAT se trouve généralement dans le sillon auriculaire-ventriculaire dérivé de l'épicarde. Les cellules dérivées de l'épicarde chez la souris peuvent se différencier en adipocytes sous l'influence de la transformation mésenchymateuse et de l'expression de *PPARγ*, ce qui n'est pas surprenant car l'activité de *PPARγ* est nécessaire à la différenciation adipogénique (**Figure 26**).

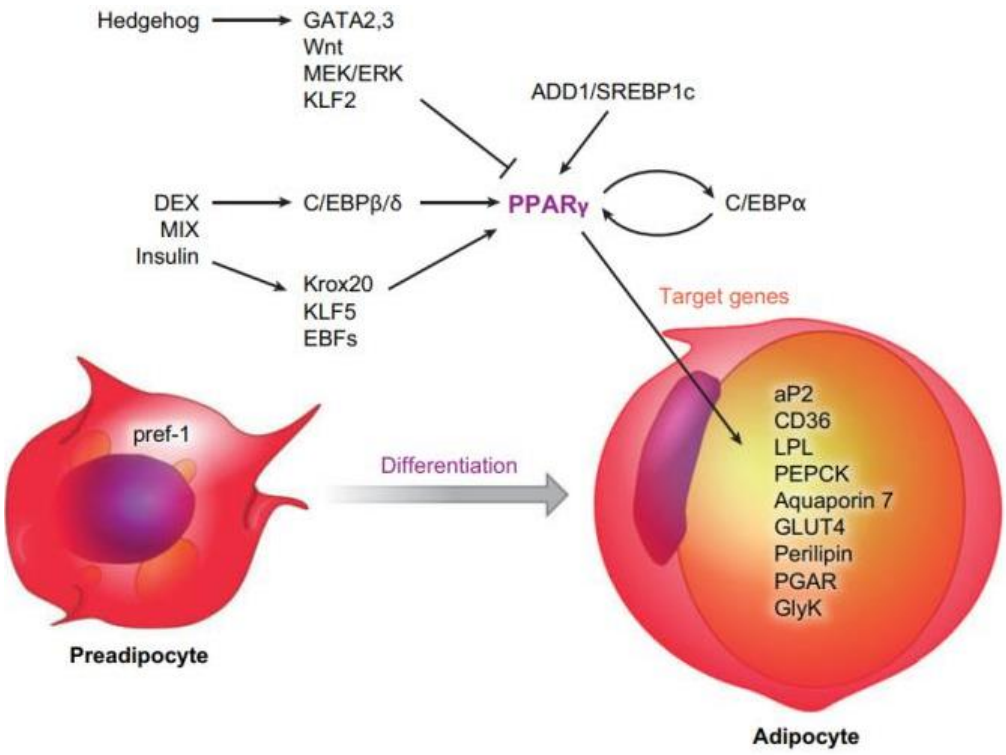


Figure 26 : *PPARγ* dans l'adipogenèse.

PPARγ, le principal régulateur de l'adipogenèse, occupe une position centrale dans la cascade adipogénique, formant une boucle de rétroaction avec C/EBPα. Diverses voies de signalisation agissent en amont de *PPARγ*, y compris les voies Hedgehog et Wnt, C/EBPβ et -δ, ainsi que les EBF. Pref-1 est un marqueur des préadipocytes. L'activation de *PPARγ* favorise la différenciation terminale en induisant une variété de gènes cibles indispensables pour l'absorption et le stockage des triglycérides, notamment aP2, *CD36*, LPL, PEPCK et d'autres. ADD1/SREBP1c: sterol regulatory element binding protein ; C/EBP, CAAT/enhancer binding protein ; DEX, dexaméthasone ; GlyK, glycérol kinase ; MIX, méthylisobutyl xanthine.(Adapté de Tontonoz et al., 2008)

Il a récemment été mis en évidence que l'activation de *PPARγ* stimule non seulement la différenciation des préadipocytes résidents du tissu adipeux en adipocytes, mais favorise également la mobilisation des cellules progénitrices circulantes dérivées de la moelle osseuse vers le tissu adipeux blanc et leur différenciation ultérieure en adipocytes (Hausman GJ and Hausman DB, 2006). La différenciation des préadipocytes en adipocytes se déroule en quatre étapes distinctes. Tout d'abord, les préadipocytes quittent le cycle cellulaire et réduisent l'expression des gènes associés au phénotype préadipocytaire. Ensuite, lors de l'expansion clonale mitotique, une dernière division cellulaire a lieu. Environ 48 heures après le début de la différenciation, les cellules commencent à acquérir

le phénotype adipocytaire précoce, puis se développent en adipocytes différenciés, exprimant pleinement les gènes associés au stockage énergétique et au métabolisme des graisses, tels que *C/EBPβ* et *PPARγ*.

PPARγ n'est pas le seul acteur dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en adipocytes, mais joue un rôle majeur dans un réseau complexe de facteurs de transcription, de corépresseurs et de coactivateurs qui régulent la formation des adipocytes. Dans le tissu adipeux blanc, *PPARγ* favorise la différenciation des adipocytes, l'absorption et le stockage des acides gras dans les gouttelettes lipidiques, réduisant ainsi les dépôts lipidiques ectopiques et augmentant la sensibilité à l'insuline (Gross et al., 2017 ; Dubois et al 2017). Des études récentes ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'activité de *PPARγ* dans le tissu adipeux. Par exemple, le tissu adipeux blanc viscéral est associé à un risque accru de maladies cardiovasculaires, (Oikonomou et al., 2019) le tissu adipeux brun et beige protège le système cardiovasculaire en favorisant la dépense énergétique (Oikonomou et al., 2019). De plus, les dépôts de tissu adipeux distants agissent comme des régulateurs endocriniens cardiovasculaires, tandis que le tissu adipeux épicardique et périvasculaire modulent les fonctions cardiovasculaires par le biais d'effets paracrines (Oikonomou et al., 2019 ; Ha and Bauer, 2018). En cas d'obésité, de diabète ou d'inflammation, le sécrétome adipeux devient proinflammatoire et proathérogène, augmentant ainsi le risque de maladie cardiovasculaire (Oikonomou et al., 2019). Dans le tissu adipeux brun, *PPARγ* induit l'expression de protéines de biogenèse thermogéniques et mitochondriales, telles que la protéine de découplage 1 (*UCP1*), la protéine à doigt de zinc 16 contenant le domaine PR (*PRDM16)* et la *PG*C1α. De plus, *PPARγ* régule la différenciation des adipocytes bruns. Le traitement par les glitazones active le brunissement du tissu adipeux blanc et augmente l'expression de l'UCP1, favorisant ainsi la thermogenèse.

Outre son implication dans la différenciation des adipocytes, *PPARγ* participe également à la fonction des cellules matures. En tant que principal régulateur du stockage lipidique dans le tissu adipeux blanc, *PPARγ* favorise la libération des acides gras à partir des lipoprotéines circulantes en régulant l'expression de la lipoprotéine lipase, et stimule leur absorption en augmentant l'expression de l'acide gras translocase *CD36* et de la

protéine de transport des acides gras *FATP1* (Schoonjans et al.,1996 ; Martin et al., 2000 ; Bogacka et al., 2004). De plus, *PPARγ* régule la rétention/transport intracellulaire des acides gras en contrôlant l'expression des protéines de liaison aux acides gras. L'expression de la périlipine, une protéine associée aux gouttelettes lipidiques des adipocytes, est également stimulée par *PPARγ,* jouant ainsi un rôle crucial dans la régulation du stockage lipidique et de l'accumulation de graisse corporelle.

C. *PPARγ* dans le développement embryonnaire

Des études sur des embryons *PPARγ*$^{-/-}$ ont montré une hypoplasie ventriculaire sévère à E9.5, ce qui suggère que *PPARγ* est indispensable au développement cardiaque (Barak et al., 1999). De plus, des modèles murins knock-out pour le gène *PPARγ* ont présenté une hypertrophie cardiaque et une cardiomyopathie dilatée (Duan et al., 2005 ; Ding et al., 2007), soulignant la complexité du rôle de ce gène dans le développement cardiaque. En particulier, *PPARγ* est crucial pour le développement de la membrane ventriculaire du septum interventriculaire. Une haploinsuffisance de *PPARγ* dans l'endocarde, la crête neurale ou le SHF n'affectait pas la septation ventriculaire, mais une expression altérée de *PPARγ* dans le myocarde embryonnaire pouvait conduire à une communication interventriculaire. Ces résultats indiquent que *PPARγ* dans le myocarde est essentiel pour le développement de la septation membranaire ventriculaire (Zhou et al., 2020 ; pas Rammah et al., 2022).

L'épicarde, en tant que mésothélium externe non contractile du cœur, se développe et s'étend à la surface du cœur au début du développement embryonnaire, généralement entre les jours embryonnaires E9,5 et E10,5 chez la souris (Virágh and Challice, 1981). L'adoption du destin adipocytaire *in vivo* nécessite l'activation de la voie *PPARγ*. Ce processus peut être déclenché de manière ectopique dans l'épicarde ventriculaire des souris, que ce soit pendant les stades embryonnaires ou à l'âge adulte, par l'expression et l'activation de *PPARγ* lors de la transition épicarde-mésenchymateuse. Chez les embryons humains, les cellules épicardiques ventriculaires expriment naturellement *PPARγ*, ce qui

explique l'abondance de tissu adipeux observée dans le cœur dès la naissance et tout au long de la vie (Yamaguchi et al., 2015). Une fois formé, l'épicarde agit comme une source de facteurs de croissance sécrétés qui influent sur l'expansion mitogène du muscle cardiaque ventriculaire et sur la mise en place des vaisseaux sanguins coronaires (Sucov et al., 2009). De plus, il abrite une population de cellules progénitrices multipotentes (Riley, 2012). Après sa formation, l'épicarde subit une transformation pour donner naissance à des cellules mésenchymateuses qui occupent l'espace sous-épicardique, entre l'épicarde et le muscle cardiaque. Certaines de ces cellules se regroupent autour des tubes endothéliaux coronaires en développement pour former la couche musculaire lisse des vaisseaux coronaires matures. Pendant ce temps, une autre sous-population migre sous forme de cellules individuelles dans le muscle cardiaque et devient la principale source de fibroblastes cardiaques, qui sécrètent la matrice extracellulaire nécessaire à la structure cardiaque mature. Bien que ces deux destins soient bien établis, d'autres hypothèses sur les rôles potentiels de l'épicarde, telles que son implication dans la formation de cardiomyocytes et d'endothélium coronaire dans des conditions normales sont encore à l'étude et pourraient révéler des fonctions nouvelles et inattendues dans le développement et la régénération cardiaques.

Les différences dans la présence et la quantité de tissu adipeux épicardique entre les espèces sont attribuées au déploiement de la voie moléculaire *PPARγ* (Yamaguchi et al., 2015). Cette voie joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire, notamment dans la placentation des mammifères et la régulation de la différenciation des trophoblastes, ainsi que dans le contrôle du transport materno-fœtal et d'autres processus de développement (Barak et al., 2008 ; Kadam et al., 2015).

Des études sur l'expression génique basées sur des puces à ADN ont été menées sur le cœur embryonnaire afin d'établir la signature génétique des futurs domaines sous-pulmonaires et sous-aortiques dans les parois inférieure et supérieure de l'OFT de souris E10.5. (Rana et al., 2014 ; Rammah et al., 2022) (**Figure 27**). L'analyse des gènes enrichis dans ces régions révèle une activité de la voie de signalisation PPAR, notamment une expression accrue des transcrits *Pparα* et *Pparγ* dans la région sous-pulmonaire. Plus précisément, *PPARγ* est l'un des gènes les plus enrichis dans cette région (Rammah et al., 2022). Cette régulation transcriptionnelle de *PPARγ* dans l'OFT est le résultat d'une

double régulation par *TBX1* et *HES1*, deux régulateurs qui agissent sur des populations complémentaires de cellules progénitrices du pôle artériel dans le SHF (Rochais et al., 2009 ; Théveniau-ruissy et al., 2008, Théveniau-ruissy et al., 2014, Rammah et al., 2022). *Pparγ* est exprimé dans un domaine dépendant de *Tbx1* de l'OFT, ce qui peut résulter d'une activation transcriptionnelle directe de *Pparγ* par *TBX1* dans la région sous-pulmonaire et/ou d'une inhibition par *HES1* dans la région sous-aortique (Rochais et al., 2009).

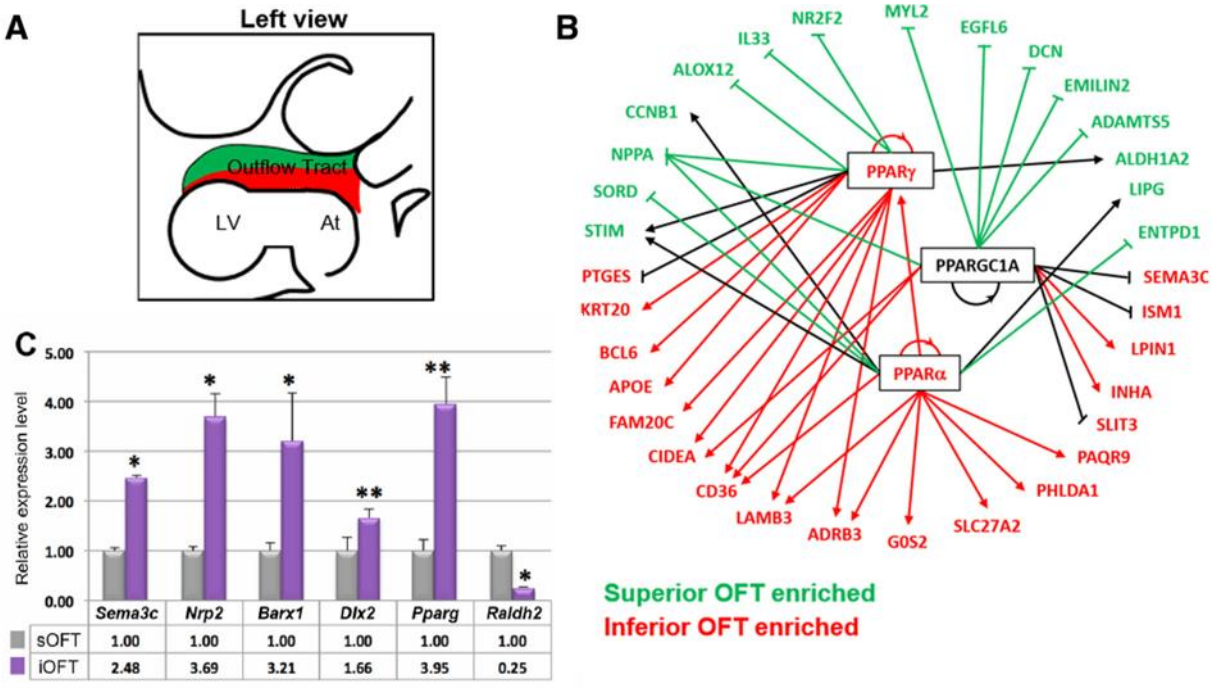


Figure 27 : Analyse transcriptomique du sOFT et du iOFT.

A) Représentation schématique de l'embryon au stade embryonnaire (E) 10,5, illustrant les voies d'écoulement supérieures (en vert) et inférieures (en rouge). B) Validation par qRT-PCR des gènes exprimant des transcrits enrichis dans l'iOFT (*Sema3c, Nrp2, Barx1, Dlx2* et *PPARγ*) ou dans le sOFT (*Raldh2*). C) Analyse de transcription quantitative inverse par polymérase en chaîne des gènes codant les transcrits enrichis dans l'iOFT (*Sema3c, Nrp2, Barx1, Dlx2 et PPARγ*) ou dans la sOFT (*Raldh2*) (Adapté de Rammah et al., 2022 et Rana et al., 2014).

D. *PPARγ* en tant que capteur nutritionnel

PPARγ n'est pas seulement impliqué dans la différenciation des adipocytes, *PPARγ* joue également un rôle dans la fonction des cellules matures. Principalement, *PPARγ* est un acteur clé dans le stockage des lipides dans le tissu adipeux blanc (Way et al., 2001). Il favorise la libération des acides gras libres à partir des lipoprotéines circulantes en régulant l'expression de la lipoprotéine lipase, et il stimule leur absorption en augmentant l'expression de *CD36* et de *FATP1*, (Bogacka et al., 2007) des protéines impliquées dans le transport des acides gras. De plus, *PPARγ* contrôle la rétention et le transport intracellulaire des acides gras libres en régulant l'expression des protéines de liaison aux acides gras (Schachtrup et al., 2004). Il favorise également l'estérification des acides gras libres en triglycérides et leur stockage en régulant l'expression d'enzymes telles que la phosphoénol pyruvate carboxykinase, le glycérol phosphate déshydrogénase et la diacylglycérol O acyltransférase. De plus, l'expression de la périlipine, une protéine associée aux gouttelettes lipidiques des adipocytes qui régule le stockage des lipides et l'accumulation de graisse corporelle, est également régulée par *PPARγ* (Bogacka et al., 2007). Enfin, *PPARγ* participe à la synthèse de novo des acides gras libres en régulant directement ou indirectement l'expression d'enzymes telles que l'acide gras synthase, l'acétyl-CoA synthétase et la stéaroyl-CoA désaturase 1 (Bogacka et al., 2007).

Dans un contexte métaboliquement altéré, comme dans certaine maladie, l'activation de *PPARγ* semble bénéficier des paramètres métaboliques, tandis que chez les individus en bonne santé, sa régulation négative présente des effets anti-obésité (Garcia-Fuentes et al., 2010). Cette dualité se manifeste également dans l'expression de *PPARγ*, où les réponses métaboliques varient entre les individus en bonne santé et ceux atteints de maladies métaboliques. Par exemple, un régime riche en graisses entraîne une augmentation de l'expression de *PPARγ* chez les sujets sains, mais une diminution chez les personnes souffrant d'obésité morbide (Garcia-Fuentes et al., 2010). De plus, des études suggèrent que les modèles de méthylation du gène *PPARγ* peuvent être influencés par la nutrition maternelle pendant la grossesse, ce qui pourrait avoir des répercussions métaboliques à long terme chez la progéniture. Ces observations soulignent le rôle crucial de la programmation métabolique précoce dans la susceptibilité aux maladies métaboliques plus tard dans la vie (Lendvai et al., 2016).

Les faibles niveaux de vitamine D dans le plasma sont associés à un risque accru de diabète de type 2, d'hypertension, de dyslipidémie et de syndrome métabolique,

indépendamment de l'IMC. De plus, la carence en vitamine D prédispose au diabète dans les modèles animaux, tandis que la supplémentation en vitamine D semble prévenir la maladie (Van Belle et al., 2013). Le calcitriol, la forme active de la vitamine D, et *PPARγ* semblent exercer des effets protecteurs contre la perturbation de l'homéostasie métabolique. Un autre aspect paradoxal réside dans le fait que le calcitriol augmente l'adipogenèse chez l'homme. Dans les préadipocytes humains sous-cutanés, le calcitriol induit des effets similaires à ceux de *PPARγ* sur la maturation et la différenciation des adipocytes, augmentant notamment l'expression de l'enzyme Fatty Acid Synthase et favorisant la lipogenèse. Cependant, lorsque l'organisme atteint un seuil critique de lipides, le *PPARγ* peut ne plus être capable de gérer efficacement les lipides, entraînant la lipotoxicité et contribuant à la progression des conditions métaboliques associées à l'obésité (Macias-Gonzalez et al., 2009).

Des recherches menées sur des modèles animaux ont exploré les conséquences des modifications du régime alimentaire maternel pendant les premières phases du développement, y compris la grossesse et l'allaitement, sur la santé de la progéniture, soutenant ainsi l'idée d'une transmission intergénérationnelle des maladies cardiovasculaires et métaboliques (El Hajj et al., 2014 ; Jiménez-Chillarón et al., 2012 ; Poston, 2012). Des altérations dans la méthylation des gènes ont été identifiées comme étant cruciales pour la régulation à la hausse des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras hépatiques et la gluconéogenèse dans des tissus à forte demande énergétique, tels que le foie et le muscle cardiaque. Alors que des études récentes sur des modèles de surnutrition maternelle chez les rongeurs ont observé une régulation à la hausse de l'expression hépatique de *PPARγ*, les effets de la mauvaise nutrition ont été associés à *PPARα* et au récepteur des glucocorticoïdes (*Nr3c1,* ou *Gr*) (Burdge et al., 2007 ; Lillycrop et al., 2005 ; Slater-Jefferies et al., 2011).

Dans le placenta humain, la présence de *SIRT1* s'étend à plusieurs régions, y compris la couche syncytiotrophoblastique, les cytotrophoblastes, l'épithélium amniotique et la couche trophoblastique du chorion et aux cellules déciduales, où il coexiste avec *PPARγ*, entraînant des effets anti-inflammatoires (Ackerman et al., 2005 ; Lappas et al 2002). Des recherches futures sont nécessaires pour explorer les interactions entre *SIRT1*, *PPARγ* et d'autres facteurs de transcription dans les tissus gestationnels humains et pour

comprendre leur rôle dans les mécanismes d'adaptation au stress en cas de conditions nutritionnelles défavorables.

La progéniture exposée à un régime maternel pauvre en protéines pendant la grossesse et l'allaitement présente un risque accru de développer l'obésité, l'intolérance au glucose et le diabète à mesure qu'elle vieillit ou lorsqu'elle est soumise à un régime riche en énergie. Des études sur les réponses cellulaires sous-jacentes ont révélé une prolifération accrue des préadipocytes (Zhang et al., 2007) associée à une activité accrue de *PPARγ* chez les rats soumis à une restriction protéique prénatale. De plus, une augmentation de la signalisation de *PPARγ* améliore l'absorption du glucose dans les adipocytes (Picard and Auwerx, 2002) un phénomène également observé chez la progéniture de rats exposée à un régime maternel pauvre en protéines pendant la grossesse et l'allaitement (Ozanne et al., 1997). Il a été récemment démontré que l'alimentation riche en graisses chez les souris entraîne une modification du métabolome hépatique, entraînant un remodelage du transcriptome de l'horloge hépatique, le recrutement de la chromatine de *PPARγ* (Eckel-Mahan et al., 2013) peut potentiellement augmenter la susceptibilité au développement des troubles métaboliques tels que l'obésité, le diabète et le cancer.

Le co-activateur transcriptionnel du récepteur gamma activé par *PPARγ*, connu sous le nom de PGC-1α, est essentiel dans la régulation de la production d'énergie au cours du développement périnatal cardiaque. L'expression du gène PGC-1α augmente parallèlement à la capacité de production énergétique pendant cette période. La surexpression de PGC-1α dans les myocytes cardiaques en culture ou dans le muscle cardiaque de souris transgéniques entraîne une augmentation du contenu mitochondrial, des enzymes du cycle des acides gras et de la respiration (Lehman et al., 2000). PGC-1α agit comme un régulateur clé de la fonction mitochondriale et joue un rôle crucial dans la conversion des stimuli physiologiques en production d'énergie dans le cœur. Les niveaux de PGC-1α sont corrélés avec la quantité de protéines mitochondriales, la masse mitochondriale et la capacité oxydative du cœur, ce qui indique que PGC-1α est un régulateur principal de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme énergétique (Garnier et al., 2003 ; Lehman et al., 2000).

E. *PPARγ* dans le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriale

Le cœur fœtal dépend principalement du glucose et du lactate comme sources d'énergie. Cependant, à la période périnatale, il subit une biogenèse mitochondriale suivie d'un processus de maturation, qui lui confère une forte capacitée d'oxydation des acides gras et un changement de préférence de substrat des glucides vers les acides gras. Chez les adultes en bonne santé, les acides gras constituent la principale source d'énergie cardiaque, avec plus de 95% de la production d'ATP se produisant par phosphorylation oxydative mitochondriale. Cependant, dans l'insuffisance cardiaque, la biogenèse mitochondriale est compromise, contribuant ainsi à la dysfonction mitochondriale. Un régulateur transcriptionnel clé de la biogenèse mitochondriale est le coactivateur *PPARγ-1α* (*PGC1-α),* (**Figure 28**) qui active l'expression de *NRF-1* et *NRF2*, des facteurs de transcription impliqués dans la réplication mitochondriale et la maintenance de la chaîne de transport d'électrons (Finck and Kelly, 2006). Dans l'insuffisance cardiaque, l'activité de *PGC1α* est réprimée, entraînant une diminution de la biogenèse mitochondriale (Finck and Kelly, 2006). De plus, le facteur de transcription *PPARα*, qui régule l'oxydation des acides gras dans le cœur, est également réprimé dans le cœur défaillant, réduisant ainsi l'expression de gènes impliqués dans l'absorption et l'oxydation des acides gras.

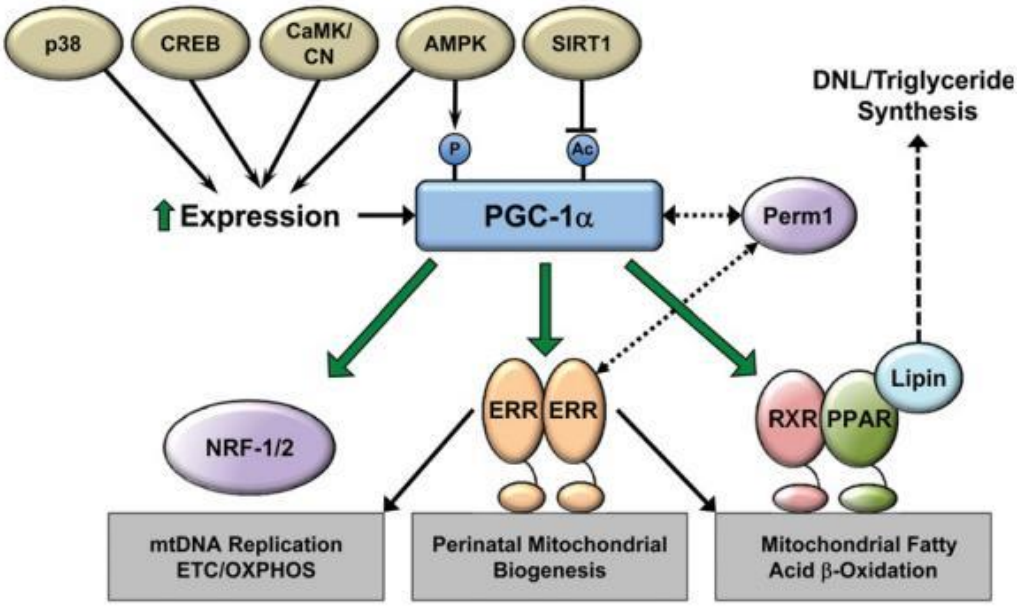


Figure 28 : La régulation transcriptionnelle de *PGC-1α* :

L'expression et l'activité de PGC1α sont influencées par différentes voies de signalisation amont qui répondent aux stimuli physiologiques et métaboliques, régulant ainsi la biogenèse et la fonction mitochondriales. PGC-1α interagit directement avec plusieurs facteurs de transcription liés à l'ADN et les coactiveurs de transcription liés à l'ADN, régulant pratiquement tous les aspects de la biogenèse, de la dynamique et du maintien des niveaux de protéines mitochondriales. Ces voies de signalisation amont comprennent notamment le CREB (protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc), CaMK (kinase dépendante du calcium et de la calmoduline), CN (calcineurine), AMPK (kinase activée par l'AMP), *SIRT1* (sirtuine 1), Perm1 (régulateur *PGC-1* et ERR dans le muscle 1) et RXR (récepteur X rétinoïde) (Adapté de Dorn et al., 2015).

La lipotoxicité se réfère aux conséquences de l'accumulation de lipides dans le cœur, déclenchant des voies de signalisation qui altèrent sa fonction. Il est crucial de souligner que l'augmentation de l'oxydation des acides gras en elle-même ne conduit pas nécessairement à la lipotoxicité. Cela a été clairement démontré dans de nombreuses études sur les cœurs Acc-/-, (Acétyl-CoA Carboxylase) caractérisés par des niveaux élevés d'oxydation des acides gras dus à une réduction du malonyl CoA (Shao et al., 2020). ACC joue un rôle clé dans le métabolisme des acides gras en catalysant la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, un intermédiaire important dans la synthèse des acides gras. La lipotoxicité représente un mécanisme majeur augmentant le risque d'insuffisance cardiaque chez les patients diabétiques (Nakamura and Sadoshima, 2020). Elle survient lorsque la capacité oxydative mitochondriale ne peut pas s'adapter à une accumulation excessive de lipides dans le myocarde, comme c'est le cas dans l'obésité ou le diabète, ou dans des modèles animaux surexprimant des transporteurs d'acides gras ou des activateurs transcriptionnels régulant les voies oxydatives des acides gras, tels que *PPARα* ou *PPARγ*. L'accumulation de lipides est depuis longtemps observée dans les cœurs défaillants en phase terminale, et elle est aggravée lorsque l'insuffisance cardiaque est associée au diabète. Les mécanismes sous-jacents de la lipotoxicité, en particulier dans le contexte du diabète (Sharma et al., 2004). Ils incluent le stress oxydatif, (Tsushima et al., 2018) la suppression de l'autophagie, (Jaishy et al., 2014), le découplage mitochondrial, (Jaishy et al., 2014 ; Boudina et al., 2007) l'altération de la dynamique mitochondriale (Tsushima et al., 2018), l'accumulation d'intermédiaires lipidiques toxiques tels que les céramides ou le diacylglycérol, (Jaishy et al., 2014) le stress du réticulum endoplasmique (Bosma et al., 2014) et l'inflammation (Mouton et al., 2020).

Il est important de noter que *PPARγ* participerait activement à la fonction mitochondriale et à la régulation de leur fonction. PGC-1α et PGC-1β interagissent avec des récepteurs nucléaires comme PPAR et ERR pour moduler l'expression des gènes impliqués dans la fonction cardiaque et le métabolisme énergétique. PGC-1 est impliqué dans l'adaptation des cellules cardiaques aux changements métaboliques qui se produisent au cours du développement embryonnaire. Le récepteur nucléaire coordonne principalement l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux impliqués dans la biogenèse, la morphogenèse et la dynamique mitochondriales, régule l'oxydation des acides gras médiée par les mitochondries et améliore le métabolisme énergétique (Corona and Duchen, 2016). Des études *in vivo* réalisées chez des souris transgéniques ont confirmé l'importance de PGC-1α dans la biogenèse mitochondriale, tant dans le muscle squelettique que dans le cœur. Dans le muscle squelettique, la surexpression de PGC-1α stimule la biogenèse mitochondriale et induit un phénotype musculaire plus oxydatif, influençant ainsi la détermination du type de fibres musculaires (Lin et al., 2002). Au niveau cardiaque, la surexpression de PGC-1α favorise la biogenèse mitochondriale, avec un effet fortement dépendant du stade de développement. Une prolifération mitochondriale importante est observée pendant la période néonatale, tandis qu'à l'âge adulte, l'augmentation de la densité mitochondriale reste modeste. De plus, l'induction prolongée de PGC-1α chez la souris adulte peut conduire à une cardiomyopathie réversible (Russell et al., 2004). La dynamique mitochondriale, qui englobe les processus de fusion et de fission, est considérée comme un mécanisme essentiel pour déterminer le destin des mitochondries et des cellules après des agressions sévères. En effet, les cycles successifs de fusion et de fission permettent d'éliminer les organites dysfonctionnels et de réparer l'ADN mitochondrial potentiellement endommagé après une exposition à des agents toxiques (Itoh et al., 2012). Une diminution de l'expression de PGC-1α est associée à une baisse du taux d'expression de plusieurs protéines mitochondriales impliquées dans ces processus de fusion-fission, ce qui affecte négativement la dynamique mitochondriale et conduit à un dysfonctionnement des mitochondries, révélant ainsi la relation entre l'agoniste de *PPARγ* et la dynamique mitochondriale (Zolezzi et al., 2013).

Il est important de noter que les facteurs de transcription comme *PPAR* ne contrôlent pas seulement la biogenèse mitochondriale, mais régulent également les composants de la mitophagie et de la dynamique mitochondriale. De manière fascinante, les signaux de mitophagie semblent communiquer avec la machinerie biogénique, probablement par le biais de la régulation de *PGC-1α* (Shao et al., 2020). Il est donc possible, voire probable, que d'autres signaux existent pour réguler de manière coordonnée la mitophagie, la dynamique mitochondriale et la biogenèse. Il est évident que maintenir l'homéostasie de la masse mitochondriale et répondre aux besoins énergétiques des tissus nécessite une synthèse biogénique de nouveaux composants mitochondriaux qui doit être coordonnée, dans l'espace et dans le temps, avec l'élimination des mitochondries anciennes ou endommagées.

Pour conclure, les mécanismes de la dynamique mitochondriale et l'importance du métabolisme énergétique relatif au développement cardiaque sont encore très peu connus.

Objectifs

Des analyses statistiques ont révélé que l'obésité chez la mère constitue un facteur de risque majeur de malformations congénitales, en particulier des anomalies cardiaques affectant la région conotroncale où l'aorte et le tronc pulmonaire se rejoignent. Cette région cardiaque résulte de l'allongement de l'outflow tract (OFT), nécessitant l'apport de cellules progénitrices provenant du deuxième champ cardiaque. Cette contribution est essentielle pour la formation correcte des structures cardiaques comme l'aorte ascendante et l'artère pulmonaire. Nous avons précédemment discuté de l'importance des facteurs de transcription et des voies de signalisation dans le développement cardiaque. La perturbation de ces éléments peut entraîner des anomalies dans le développement de l'OFT. Par exemple, des défauts dans les voies de signalisation BMP, Wnt, et TGF-β peuvent provoquer des malformations dans la région conotroncale, affectant spécifiquement l'OFT. En analysant les profils d'expression génique, le rôle crucial du récepteur lipidique *Pparγ* a été mis en évidence comme régulateur de l'identité régionale de l'OFT (Rammah et al., 2022). *Pparγ* est un facteur de transcription clé dans la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et dans divers processus cellulaires, y compris la différenciation et la prolifération cellulaire. Des études récentes ont montré une association entre *Pparγ* et certaines voies métaboliques (Motojima, 1993). *Pparγ* influence le métabolisme des acides gras et la glycolyse, deux processus énergétiques essentiels pour le développement cardiaque. Par exemple, *PPARγ2* semble être localisée dans la matrice mitochondriale et régule la transcription de l'ADN mitochondrial. Il semble que *PPARγ2* affecte la respiration mitochondriale en influençant l'expression des gènes de la chaîne de transport d'électrons (Bourges et al., 2004).

Toutefois, les mécanismes sous-jacents de l'association entre l'obésité maternelle et l'augmentation du risque de malformations cardiaques restent encore méconnus, ainsi que le statut métabolique du cœur à des stades précoces du développement cardiaque embryonnaire. Ainsi, le premier objectif de ma thèse a été d'évaluer, à l'aide d'un modèle murin, l'impact potentiel de l'obésité maternelle sur le développement cardiaque

embryonnaire (Partie I). Par la suite, nous avons examiné le rôle de *Pparγ* dans la régulation des cellules progénitrices cardiaques pour le développement de l'outflow tract (Partie II-A). Enfin, nous avons analysé les changements dans le profil métabolique énergétique des progéniteurs de l'OFT et des ventricules au cours des premiers stades du développement (Partie II-B).

Matériel et méthodes

Ligné de souris, souris transgéniques, croisement et génotypage

Les souris sauvages CD1 proviennent de Janvier Labs (France). Les lignées Mesp1-Cre (Saga et al., 1999) et *Pparγ* ^{fl}/^{fl} (Cui et al., 2002) ont été décrites précédemment. Les souris ont été maintenues sur des lignées mixtes (C57Bl/6 et CD1) et consanguines (FVB/N). Les animaux sont soumis à régime nutritionnel standard SAFE 150 (Scientific Animal Food and Engineering, France) dont la composition nutritionnelle provient pour 18% de protéines, 4,8 % de graisses et 4,2 % de glucides. Les soins apportés aux animaux ont été conformes aux directives nationales et institutionnelles (A1-1180).

Pour le modèle d'obésité maternelle induite (APAFIS#26179) les femelles sont soumises à un régime contrôlé riche en graisse, SAFE 292HF dont la composition nutritionnelle provient de 22,41 % de protéines, 35,57 % de graisses et 12,35 % de glucides. Les femelles ont été placées dans un régime témoin ou riche en graisses à partir de l'âge de 5-6 semaines et pendant au moins 8 semaines avant le début de la reproduction. Les deux groupes ont été hébergés dans des conditions identiques, sans pathogènes spécifiques, avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Au départ et pendant les 8 semaines de régime, les souris ont été pesées et la glycémie de la queue a été mesurée à l'aide d'un glucomètre en suivant les instructions du fabricant. La prise alimentaire a été mesurée et les granulés ont été changés chaque semaine. Après 8 semaines de régime, les femelles ont été croisées avec des mâles (soumis à un régime normal) pour l'accouplement et sont restées soumises au même régime.

Pour les expériences sur les embryons, le stade de développement a été déterminé en considérant midi le jour de l'apparition d'un bouchon de copulation comme le jour embryonnaire (E) 0,5. Pour la collecte des tissus, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Les souris ont été génotypées à l'aide d'ADN extrait des extrémités de la queue ou des sacs vitellins des embryons, et de la queue ou des oreilles chez les adultes. Les souris ont été génotypées à l'aide du kit PCR Phire Animal Tissue (Life Technologies). La PCR a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques énumérées dans la Table 11. Les conditions d'expérience utilisées étaient une pré-dénaturation à 94°C pendant 5 minutes, 30 ou 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, un recuit à 60°C pendant 45 secondes, une élongation à 72°C pendant 45 secondes et une élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de détecter les fragments amplifiés spécifiques.

Lignées de souris	Amorces	Sequence 5'-3'	Taille du fragement
PPARγ $^{fl/+}$	IMR1934	TGT AAT GGA AGG GCA AAA GG	WT= 200 pb Mut = 230 pb
	IMR1935	TGG CTT CCA GTG CAT AAG TT	
Mesp1-CRE	CRE3 -For	AGGTTCGTTCACTCATGGA	200 pb
	CRE4 -Rev	TCGACCAGTTTAGTTACCC	

Table1. Amorces PCR et taille de l'amplicon pour le génotypage

Traitement des tissus

Les embryons ont été prélevés à différents stades de développement et disséqués dans 1x PBS (solution saline tamponnée au phosphate) à 4°C.

Inclusion dans la paraffine : Les embryons ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4% (PFA) pendant au moins 2 heures à 4°C et déshydratés avant l'inclusion (Paraplast X-TRA, Sigma P3808). Les embryons ont été orientés en position latérale tandis que les cœurs fœtaux ont été orientés dorsalement pour la coupe transversale à quatre chambres. En revanche, la cryopréservation a été réalisée après 10 minutes de fixation dans du PAF à 4% et une incubation dans une série de sucrose (15% et 30%, 1 jour chacun, 4°C). Les embryons ont été inclus dans de l'OCT (VWR, 361603E) en position latérale et conservés congelés à -80°C.

Primary antibodies	Species	Dilution	Reference
MF20	Mouse monoclonale	1/50	DSHB
PRDM16	Rabbit	1/100	Abcam ab106410
Secondary antibodies	**Species**	**Dilution**	**Reference**
Anti-Mouse Alexa Fluor 647	Donkey	1/1000	ThermoFisher A31571
Anti-Rabbit Alexa Fluor 488	Donkey	1/500	ThermoFisher A21206

Table 2. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunomarquage

Immunofluorescence sur coupes de paraffine

Des coupes sériées de paraffine de 10µm d'épaisseur ont été obtenues et montées sur des lames Superfrost plus (Thermo Fisher Scientific). Les coupes ont été désaffinées (xylène), réhydratées dans une série d'éthanol (100, 90, 70% et H2O) et incubées dans une solution bouillante de démasquage de l'antigène (Vector Laboratories, H-3300) pendant 15 minutes. Les lames ont été refroidies à température ambiante (TA) pendant 20 minutes, lavées trois fois avec du PBS/0,05 % de Tween 20 (PBST) et incubées dans du tampon de blocage TNB (0,1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,5 % (p/v) de réactif de blocage (PerkinElmer FP1020)) pendant 1 heure à TA avant d'être incubées avec des anticorps primaires dilués au TNB (tableau 12) pendant une nuit à 4 °C. Après trois lavages dans du PBST, les coupes ont été incubées avec des anticorps secondaires dilués au TNB pendant 1 heure à température ambiante, rincées dans du PBST et les noyaux ont été colorés avec du Hoescht (1/1000) dans du PBS. Les lames ont été montées avec Fluoromount (Southern Biotech) et imagées à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss AxioImager équipé d'un module Apotome.

Longueur de l'OFT

Les mesures de l'OFT ont été effectuées sur des vues entières des cœurs embryonnaires en utilisant les repères OFT Axioimager identifiant l'OFT proximal et distal (**Figure 31 B**). La longueur distale a été considérée jusqu'au début du ventricule droit identifié par les structures ventriculaires. Les mesures de la longueur de l'OFT des embryons cultivés ont été effectuées sur des vues latérales gauches en montage entier à l'aide du logiciel Zeiss Zen. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± S.E.M.

Coloration à l'Oil Red O (ORO)

Les vésicules intracellulaires d'acides gras ont été évaluées par coloration à l'Oil Red O (0,5% v/v) (Sigma Aldrich, 1320065) de cryosections sagittales de 15 µm. Les coupes ont été fixées dans du PFA 4% pendant 10 minutes, rincées deux fois pendant 5 minutes dans du PBS avant d'être colorées pendant 10 minutes à température ambiante dans une solution d'ORO. Les lames ont ensuite été rincées dans de l'eau Milli-Q pendant 5 minutes, trempées dans la solution de coloration à l'hématoxyline de Mayer afin d'identifier les noyaux cellulaires, rincées à nouveau dans de l'eau courante et de l'eau Milli-Q pendant 5

minutes. Les lames ont été montées et imagées en fond clair à l'aide d'un scanner de lames haute performance de Zeiss.

Analyse des montages entiers et examen des anomalies cardiaques

Des embryons de souris nourries au HFD et au régime standard ont été récoltés à E9,5, E10,5, E15,5 ou après la naissance. Les cœurs embryonnaires ont été fixés dans du PFA à 4%, analysés et imagés à l'aide d'un microscope stéréo à dissection Zeiss Lumar, puis inclus dans du paraffine, sectionnés en série à une épaisseur de 10µm et colorés à l'éosine en utilisant des techniques standard. Les coupes ont été examinées à la recherche de malformations cardiaques.

Coloration à l'éosine des coupes paraffine

Les coupes de paraffine de cœurs fœtaux ont été déparaffinées en les incubant deux fois avec du xylène à 100 % pendant 5 minutes. Les lames ont été réhydratées avec une série d'éthanol (deux fois avec 100% pendant 3 minutes, une fois avec 95% pendant une minute et une fois avec 70% pendant une minute). Les lames ont ensuite été incubées pendant 4 minutes dans une solution d'éosine. Les sections ont ensuite été déshydratées avec des séries graduelles d'éthanol (70 %, 95 % et 100 %) et de xylène (deux fois pendant 5 minutes chacune). Les lames ont été montées avec de l'Entellan et imagées à l'aide d'un scanner de diapositives Zeiss haute performance, le Zeiss Scanner AxioScan Z1 dans le Bradfield X20.

Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test t de Student et du test de normalité de Shapiro-Wilk dans Statistical tools for high-throughput data analysis (Outils statistiques pour l'analyse de données à haut débit). Les données sont présentées sous forme de moyennes +/- écart-type (ET) ou d'erreur-type de la moyenne (ETM). Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $P<0,05$.

Analyse du taux de consommation d'oxygène dans le cœur embryonnaire perméabilisé

Les tissus cardiaques au stade fœtal ont été isolés et perméabilisés à l'aide de saponine. La respiration mitochondriale a été évaluée à l'aide du respiromètre O2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche). La solution de respiration ne contenait ni ATP, ni ADP, ni créatine. Les cœurs ont été prélevés, puis les régions de l'OFT et les ventricules ont été isolées manuellement et lavées avec du PBS 1X. Ensuite, les tissus ont été plongés dans une solution de saponine pour les perméabiliser. Après la perméabilisation, les différentes sections ont été placées dans des chambres dans un milieu R0 (Tampon MiR05 : 0,5 mM EGTA, 3 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 60 mM K-lactobionate, 10 mM KH_2PO_4, 20 mM HEPES, 20 mM taurine, 110 mM saccharose, 1 g/L BSA sans AGF ; pH 7,1) pour éliminer toute trace d'ATP, avec un niveau d'oxygène contrôlé. Du pyruvate et du malate (1 mM et 4 mM) ont été ajoutés, suivis par de l'ADP (2 mM), du succinate (15 mM, pour activer les complexes I et II), de l'amytal (2 mM, pour inhiber le complexe I), de l'oligomycine (10 mM, pour bloquer l'ATP synthase) et enfin du tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD, 0.5 mM, pour activer le complexe IV) avec de l'ascorbate (2 mM) pour éviter l'auto-oxydation du TMPD.

Résultats

A. Résultats - Partie I

xv. Obésité maternelle et maladie cardiaque congénitale

L'obésité maternelle est un problème de santé croissant qui a des répercussions importantes sur le développement fœtal, y compris des anomalies cardiaques congénitales. Les objectifs de cette étude sont de comprendre comment l'obésité maternelle influence le développement du cœur embryonnaire et de déterminer les mécanismes sous-jacents à ces anomalies. De nombreuses études ont montré une association entre l'obésité maternelle et une incidence accrue de malformations cardiaques congénitales chez les nouveau-nés. Nous passons en revue les types de CHD les plus fréquemment observés et discutons des mécanismes possibles qui pourraient expliquer cette association. Nous examinons ensuite, comment l'obésité maternelle influence la morphogenèse cardiaque, en particulier au niveau de la région conotroncale. Nous discutons également des altérations des voies de signalisation cellulaires et des facteurs génétiques impliqués dans ces processus. Une observation clé dans nos recherches est l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans la région de l'outflow tract des embryons exposés à une alimentation maternelle riche en graisses. Nous détaillons les techniques de marquage lipidique utilisées pour identifier ces gouttelettes et analysons leur impact potentiel sur le développement cardiaque. Enfin, nous nous intéressons aux conséquences à long terme de l'exposition à un environnement riche en graisses sur les malformations cardiaques post-natales. Nous avons suivi des souris nées de mères obèses et les avons faits allaitées par des mères à régime normal pour observer les effets persistants sur le cœur. Cette partie de l'étude vise à comprendre comment les défauts cardiaques observés à des stades embryonnaires précoces se manifestent et évoluent après la naissance. L'objectif global de cette étude est de fournir une compréhension approfondie des mécanismes par lesquels l'obésité maternelle influence le développement cardiaque embryonnaire et de proposer des pistes pour des interventions préventives ou thérapeutiques pour réduire l'incidence des CHD liées à l'obésité maternelle.

Congenital heart defects related to maternal obesity

Morgane Ehrhard [1], Mayyasa Rammah [2], Robert G Kelly [2], Francesca Rochais [1] and Magali Théveniau-Ruissy [1]

[1] Aix-Marseille Univ, INSERM, MMG, U1251, Marseille, France.

[2] Aix-Marseille Univ, CNRS UMR 7288, IBDM, Marseille, France.

Abstract

Maternal obesity has emerged as a significant public health concern in industrialized countries, particularly due to its association with an increased risk of congenital heart defects (CHD) in offspring. Despite large-scale epidemiological studies highlighting this risk, the underlying mechanisms linking maternal obesity to CHD remain poorly understood. Therefore, in this study, we developed a high-fat diet (HFD)-induced maternal obesity mouse model to investigate the developmental origins of CHD under such environmental conditions. Examination of the embryos at the fetal stage demonstrated a significant increase in the prevalence of CHD in embryos from obese mothers, including defects such as ventricular septal defects (VSD), trabeculation anomalies, and hypertrophy, indicating that maternal obesity causes fetal cardiac dysfunction from early developmental stages. Investigations at earlier developmental stages demonstrated an increase in embryonic lethality, concomitant with a significant reduction in arterial pole elongation. Altogether, these results suggest a defect in SHF progenitor cell addition to the arterial pole of the heart related to HFD-induced maternal obesity. Additionally, we observed an increase in lipid vesicle accumulation in the outflow tract (OFT) and SHF regions, supported by increased expression of lipid transport and storage genes such as Pparγ, Perilipin 4, and Perilipin 5. Hence, these findings indicate that excessive maternal lipid intake during pregnancy adversely affects embryonic heart development, implicating lipid metabolism and storage pathways as critical factors in the etiology of CHD associated with maternal obesity.

Introduction

In industrialized countries, obesity is a major public health problem with a significant impact on the development of cardiovascular diseases. Various population studies have identified obesity as a risk factor for congenital heart defects (CHD) (Gilboa et al., 2010; Mills et al., 2010; Madsen et al., 2013; Turunen et al., 2024). Large-scale studies have shown a significant increase in the prevalence of severe congenital heart disease associated with maternal obesity (Morris et al., 2018; Persson et al., 2019). However, the mechanisms underlying the association between maternal obesity and increased risk of CHD remain unclear. These malformations mainly affect the arterial pole, including tetralogy of Fallot, aortic malpositions, transposition of the great vessels, as well as atrioventricular septal defects.

Normal development of the heart arises from the addition of two sources of differentiated heart field progenitor cells to the elongating cardiac tube (Jin et al., 2019) and cardiac progenitor cells of the second cardiac field (SHF) mainly contribute to the development of the outflow tract at the arterial pole of the developing heart (Kelly et al., 2001). Hence, SHF progenitor cells play a major role in the development of cardiac malformations, perturbation of progenitor deployment underlies a spectrum of common forms of CHD affecting conotruncal and septal morphogenesis (Theveniau-Ruissy et al., 2008; Rochais et al., 2009; Rana et al., 2014; De Bono et al., 2018; Rammah et al., 2022). More recently, we have demonstrated that *Pparγ* is required in SHF cardiac progenitor cells for normal heart development (Rammah et al.; 2022). We have demonstrated that PPARγ signaling related genes are regionally expressed in the outflow tract and that impairment of the PPARγ signaling pathway is leading to CHD affecting the arterial pole development. Interestingly, *Pparγ* is a master transcriptional regulator of adipogenesis that controls fatty acid uptake and metabolism by regulating the expression of proteins associated with fatty acid homeostasis (Schaiff et al., 2005). Interestingly, in humans, maternal obesity is known to alter the expression of fatty acid transporters and to lead to increased uptake of fatty acids by the placenta and excessive accumulation of fetal fat (Cetin et al., 2012; Dube et al., 2012). Therefore, in order to increase our understanding of the etiology of CHD secondary to maternal obesity in humans we have decided to develop a high fat diet-induced maternal obesity model in the mouse and we present the first evidence that maternal obesity in the mouse is also responsible for CHD.

Methods

High Fat Diet (HFD) mouse model

Mice from Janvier Labs (France) were randomly divided into normal diet (ND) and high fat diet (HFD) group. Standard and high-fat diets were obtained from SAFE (Scientific Animal Food and Engineering, France). Calories on the normal control diet came from 18% protein, 4.2% carbohydrates and 4.8% fat (SAFE 150, SAFE). Calories on the high-fat diet came from 22.41% protein, 12.35% carbohydrate and 35.57% fat (292HF, SAFE). Females were placed on control normal diet (ND) or high-fat diet (HFD) from 6 weeks of age and for at least 8 weeks before the start of breeding. Both groups were housed in identical conditions, free from specific pathogens, with a 12-hour light/dark cycle. At baseline and during the 8-week diet, mice were weighed and tail blood glucose was measured using a glucometer following the manufacturer's instructions. Food intake was measured and pellets changed weekly. After 8 weeks on the diet, females were crossed with males (on a normal diet) for mating and remained on the same diet. All animal procedures were carried out in accordance with national and institutional guidelines. (project number APAFIS # 26179).

Tissue processing

Embryos were dated taking the day of the plug as embryonic day (E) 0.5. Embryos were collected at different developmental stages and dissected in 1x PBS (phosphate-buffered saline solution) at 4°C. Paraffine embedding the embryos were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for at least 2 hours at 4°C and dehydrated prior to embedding (Paraplast X-TRA, Sigma P3808). The embryos were orientated in the lateral position whereas the fetal hearts were oriented dorsally for four-chamber cross-sectioning. In contrast, cryopreservation was achieved after 10 minutes fixation is 4% PAF and incubation in sucrose series (15% and 30%, 1 day each, 4°C). Embryos were embedded in OCT (VWR, 361603E) in lateral position and stored frozen at -80°C.

Reverse transcription quantitative real-time PCR

Total RNA from tissues or cells was extracted using Trizol (Gibco Thermo Fisher Scientific) or the RNAqeous micro kit (ThermoFisher AM1931). RNA concentrations were determined using the Nano Drop 1000 (Thermo Fisher Scientific) by measuring OD 280/260nm. Using the Maxima enzyme kit (Thermo Fisher Scientific, K1642), previously

extracted RNAs were retrotranscribed. The RT-qPCR reaction was performed using specific 0.5 µM oligonucleotides, SYBER green (Luminaris 1X, Color HiGreen qPCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific) on the LightCycler QuantStudio (Roche). Each reaction was performed in duplicate and normalized with the reference gene *Hprt*, Hprt-FOR 5'-CTGGTGAAAAGGACCTCTCG-3', Hprt-REV 5'-TGGCAACATCAACAGGACTC-3'. Designed primers are the following: *Pparγ*, Pparγ-FOR 5'-CTAGTGAAGTATACTATACTCTGTGCAGCC-3' and Pparγ-REV 5'-GTGTCATAATAAACATGGGAGCATAGAAGC-3'; *Plin4*, Plin4-FOR 5'-GGACTTACAAACAGCAACAGACC-3', Plin4-REV 5'-CATCTGTGAGTTGGTGGACACT-3'; *Plin5*, Plin5-FOR 5'-TGTGTGTAGTGTGACTACCTGTGC-3', Plin5-REV 5'-GGCAAGATCATTCACTGTGG-3'. Relative gene expression levels were analyzed using the 2-ΔΔCt method (Schmittgen and Livak, 2008).

Outflow tract length measurement

Measurements of the OFT length were done on left whole mount views of the embryonic hearts using AXIO Imager OFT landmarks identifying the proximal and distal OFT are presented in **Figure 31B**. The distal length was considered until the start of right ventricle identified by ventricular structures. Measurements of the OFT length of cultured embryos were done on whole mount left lateral views using Zeiss Zen software. Data are presented as mean ± S.E.M.

Fatty acid uptake in embryo culture

Bodipy Embryo culture was performed by Mayyasa Rammah (R Kelly laboratory, IBDM) using the technique employed by Dominguez and colleagues (Dominguez et al., 2012). Briefly, E8.5 (4-8 somite stage) embryos were microdissected without damaging the yolk sac in CO_2-independent media (Invitrogen, 18045-054) supplemented with 0.04% BSA (Bovine Serum Albumin, SIGMA A88056) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, 15140-122). Embryos were cultured in rolling bottles in a precision incubator (BTC Engineering, Cambridge, UK) for 24 hours in 75% rat serum (Harlan SR-0100 or IGBMC Strasbourg), 25% DMEM (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin. For the first 12 hours of culture, embryos were exposed to the following controlled atmosphere: 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2 and subsequently switched to 5% CO_2, 20% O_2, 75% N_2 for the remaining time of the culture. Control embryos were cultured with vehicle solution and treated embryos were cultured with

fluorescent fatty acid analogs solution BODIPY® 493/503 (10 µg/ml; molecular probes, D3922). Embryos were harvested after 24 hours at 20-24 somites and imaged using a Zeiss Lumar stereo microscope.

Oil Red O (ORO) staining

Intracellular fatty acids vesicles were evaluated by Oil Red O staining (0.5% v/v) (Sigma Aldrich, 1320065) of 15µm sagittal cryosections. Sections were fixed in 4% PFA for 10 minutes, rinsed twice for 5 minutes in PBS before staining for 10 min at RT in ORO solution. Slides were then rinsed in ultrapure Milli-Q water for 5 minutes, dipped in Mayer's hematoxylin counterstaining solution in order to identify cell nuclei, rinsed again in running water and ultrapure Milli-Q water for 5 minutes. Slides were mounted and imaged in brightfield using a high-performance slide scanner from Zeiss.

Wholemount analysis and examination of cardiac defects

Embryos from mice fed high fat and standard diet were harvested at E9.5, E10.5, E15.5. Embryonic hearts were fixed in 4% PFA, analyzed and imaged using a Zeiss Lumar stereo dissecting microscope, then embedded in paraffine, serially sectioned to a thickness of 10µm.

Eosin staining of Paraffine sections

Paraffine sections of fetal hearts were deparaffinized by incubating twice with 100% xylene for 5 minutes. Slides were rehydrated with a series of ethanol (twice with 100% for 3 minutes, once with 95% for one minute and once with 70% for one minute). The slides were then incubated for 4 minutes in eosin solution. The sections were then dehydrated with graded series of ethanol (70%, 95% and 100%) and xylene (twice for 5 minutes each). Slides were mounted with Entellan and imaged using a high-performance Zeiss slide scanner, Zeiss Scanner AxioScan Z1 in Bradfield X20.

Statistics

Statistical analyses were performed using Student's t-test and the Shapiro-Wilk normality test in Statistical tools for high-throughput data analysis. Data are presented as means $^{+}$/- standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). Differences were considered statistically significant at $P<0.05$.

Results

Maternal obesity related congenital heart defects

Since epidemiologic studies have demonstrated that maternal obesity is clearly associated to the development of CHDs we decided to shed light to such environmental risk factor. We therefore developed an experimental mouse model of maternal obesity using Swiss CD1 mice at 5-6 weeks of age. Two groups of females were compared, a normal standard diet (ND) control group and an experimental group fed with high-fat diet (HFD) (**Figure 29**). As depicted in the experimental plan (**Figure 29A**), females were treated for eight weeks before mating. Mice were weighted weekly until sacrifice when the embryos were collected after mating. Compared to ND treated mice, a highly significant increase in the body weight of HFD mice was observed (**Figure 29B**). Body weight measurements after 4 weeks of diet revealed that HFD females display a 16.12% gain of weight compared to 9.57% gain of weight of ND females. For instance, the HFD females gain 6.55% more weight than the control ND group. Besides, both control and experimental mice were monitored for blood glucose levels until sacrifice. After 8 weeks of ND and HFD uptake, none of the mice was shown to display diabetes (**Figure 29C**) referring to previous Ayala et al. (2010) report which defines the hyperglycemia threshold at 200mg/dL. Therefore, these results certify that our newly developed mouse model of HFD obesity induction is suitable for further investigation of the impact of maternal obesity on the development of CHDs in the absence of diabetes.

To determine the incidence of maternal obesity on the development of CHDs we mated HFD females with normal diet males (**Figure 30**). Hearts were recovered from embryos at fetal stage E15.5, a critical period when heart formation is completed. Histological analysis of the 70 hearts collected from the HFD group revealed CHDs in 55 hearts (79%) while only one heart over 24 displays CHDs in the ND group (4%). A significant association of CHD to maternal obesity was scored (P value= $p < 0.001$) (**Figure 30A**). Over 70 fetal hearts collected from HFD females different abnormalities were scored as ventricular septal defect (VSD) in 8 hearts (11% penetrance), ventricular compaction defect in 14 hearts (20% penetrance) and ventricular hypertrophy in 43 hearts (61% penetrance) (**Figure 30B**).Interestingly, compaction defects are mainly observed in the right ventricle, with a total of 12 compaction defects in the right versus 2 in the left

ventricle suggesting that obesity directly affects the SHF cells that contribute to the development of this region of the heart. In contrast, ventricular hypertrophy was shown to affect both ventricles. The spectrum of the ventricular septation defect also suggest that the SHF progenitor cell addition to the OFT is directly affected in HFD condition. Hence, these results demonstrate that maternal obesity secondary to HFD has a significant impact on the development of the embryonic heart and that the SHF progenitor cell deployment and derivatives are directly impacted. Interestingly, six over 70 embryos (10%) were collected dead at fetal stage indicating that lethal malformations may occur at earlier stages of development. These observations reinforce the hypothesis that maternal obesity negatively influences embryonic heart development and that alteration of the environmental factors in obese mothers and at the time of pregnancy is responsible for CHDs.

Maternal obesity impairs embryonic heart development

To address the impact of maternal obesity in early cardiac developmental, embryos were collected from both HFD and ND females at earlier developmental stages between E9.5 and E12.5. Embryonic death was scored at the different developmental stages and the heart tube elongation, a critical determinant of the OFT development was evaluated at midgestation (**Figure 31**).

At first, investigations at all developmental stages demonstrated higher incidence of embryonic death in the HFD group compared to the ND group (**Figure 31A**). From E9.5 to E12.5, the embryos from the HFD group display 12% dead embryos (24/200) while 4.1% dead embryos (16/389) were scored in the ND group. The two ND and HFD groups of embryos displayed a highly significant difference (p-value <0.0006) **.** At E9.5, 5.4% of the HFD embryos (4/74) were found dead compared to 2.9% (4/139) in the ND group. Interestingly, at E10.5, a peak of lethality was clearly identified in both groups but the mortality reached 20% (16/80) in the HFD group. Next, embryos collected from the ND group at further stages do not display embryonic death although the HFD group display 18% (2/11) and 8% (2/24) of dead embryos at E11.5 and E12.5, respectively.

We previously reported that conotruncal defects such as ventricular septal defect originates from the impairment of OFT elongation (Theveniau-Ruissy et al., 2008; Rammah et al., 2022) which is achieved by the SHF progenitor cell addition. Therefore, this morphogenic event was evaluated in the HFD group of embryos (**Figure 31B**).

Analysis of E10.5 HFD embryos demonstrate that under HFD condition the OFT morphogenesis is affected. A highly significantly shorter OFT was measured in the HFD group compared to ND group (**Figure 31C**) thus suggesting that the fat-rich maternal environment impairs the addition of the SHF progenitor cells to this crucial region of developing heart.

Lipid droplets in the OFT region

To investigate whether high-fat environment could disrupt the development of the arterial pole of the heart we investigated the competence of the SHF progenitor cells and derivatives to capture and to store fatty acids in lipid vesicles.

Fatty acid uptake in the embryo during OFT morphogenesis was investigated by culturing ND E8.5 embryos with fluorescent fatty acid analogs (Bodipy) (**Figure 32A**). After 24 hours of culture, fluorescent signal was observed in the pharyngeal region of the embryo (**Figure 32B**, by M Rammah) suggesting that the embryo is capable to uptake fatty acid from the environmental fluid and keep the molecules in storage vesicles. In order to verify this result, we checked for the presence of lipids in the SHF and OFT derivatives by performing Oil Red O (ORO) stainings at E9.5. Obtained results demonstrate that cells in the dorsal pericardial wall and OFT display lipid storage in the form of droplets (**Figure 32C**). High number of lipid vesicles were observed in the myocardium and endothelial cells of the OFT. Next, the impact of the HFD maternal obesity on the lipid storage was investigated. At E10.5, a drastic increase in the lipid vesicles was observed in the OFT of the HFD group compared to ND (**Figure 32D-E**). Then, the increase in the lipid droplet in HFD condition was indirectly investigated by RT-qPCR (**Figure 32F**). As expected, the expression of lipid droplet associated genes *Perlipin4* (*Plin4*) and *Perlipin 5* (*Plin5*) in addition to *Ppar*γ were shown significantly expressed in the OFT. These last results suggest that the accumulation of lipids in the OFT may disrupt the normal development of the OFT leading to the increase of cardiac defects or early death of the embryos.

Discussion

In industrialized countries, obesity is a major public health problem and large-scale studies have identified a significant increase in sever CHD related to maternal obesity (Morris et al., 2018; Persson et al., 2019). However, the developmental origin of such pathologies impacting preferentially the arterial pole of the heart remains obscure. We

therefore decided to investigate such origins by putting forward our expertise on studying developmental defects affecting this specific region of the embryonic heart.

First, we developed a new mouse model of maternal obesity by feeding young females females for eight weeks with a rich diet displaying 61% of energy from fat delivery (HFD mice). As expected, after eight weeks of such diet, the HFD mice present a significant difference in the gain of weight compared to the normal diet females (ND mice) which diet fatty acid content displayed only 12% of the energy. Matings of the ND and HFD females with ND males led to the collection of embryos from different developmental stages. As in humans, we first observed that the embryos from the HFD group collected from the obese mothers show a significant increase in CHDs at fetal stage. Different cardiac defects were observed such as VSD, trabeculation defects and hypertrophy demonstrating that maternal obesity causes fetal cardiac dysfuntion from early developmental stage. In addition, 10% of the embryos were collected dead in the HFD group.

In this context, we propose that the early development of the embryo was impaired. We therefore focused on the SHF progenitor cell deployment towards the arterial pole of the heart that permits the elongation of the OFT (Theveniau-Ruissy et al., 2008; Rammah et al., 2022). Previous studies have demonstrated that the deficient SHF progenitor cell addition to this region of the heart lead to CHDs (Theveniau-Ruissy et al., 2008; Rochais et al., 2009; Rana et al., 2014; De Bono et al., 2018; Rammah et al., 2022). As such, genetic ablation of *Tbx1* or *Hes1* in the SHF progenitor cells were shown to impair the normal heart development, embryos from these mouse line matings displaying obvious OFT defects, such as DORV, OAo and VSD and embryonic death starting by E9.5 (Theveniau-Ruissy et al., 2008; Rochais et al., 2009). Interestingly, although no genetic predisposition was shown in the HFD group we observed that the embryos from this group begin to die by E9.5 with a clearly peak of death at E10.5 demonstrating that the HFD mothers present significant metabolic changes that prevent the embryo to develop normally. However, the combination of genetic and environmental factors may potentiate the impairment of cardiac progenitor cell deployment and may also participate to the expansion of the number of CHD.

Furthering our understanding of the mechanisms by which a HFD maternal obesity influences the OFT development, we anticipate that lipid changes affect the OFT development. Therefore, we propose that the embryo is capable to capture circulating fatty acids from the amniotic fluid as this has been demonstrated in human (Baardman et

al., 2013). Results obtained from embryo (ND group) culture experiments using Bodipy confirm our hypothesis, supporting that the fluorescent fatty acid diffuse from the culture medium to the embryonic body and concentrate into vesicles. Although the transport process of Bodipy was not evaluated. Oil Red O staining confirmed the presence of lipid droplets in the OFT region. These droplets were particularly enriched in the OFT and SHF in embryos of the ND group. Identical approach was performed at E10.5 on sections from the embryos of both ND and HFD groups demonstrating a clear enrichment of lipid storage vesicles in the HFD group.

Since little is known about the impact of maternal metabolic perturbation on the development of the arterial pole of the heart we propose *Pparγ* as a key responsible gene. First, we demonstrated previously that *Pparγ* is required for the normal development of the embryonic heart (Rammah et al., 2022). Second, *Pparγ* is known for its pivotal role in HFD-induced obesity through regulating a number of genes associated with lipid metabolism, energy storage, adipocyte differentiation and insulin sensitivity (Kadowaki et al., 2002; Lehrke and Lazar, 2005). Therefore, we evaluated the expression of *Pparγ* in the OFT in the ND and HFD groups demonstrating a significant increase of the expressed gene in HFD condition. This last result comfort our hypothesis that *Pparγ* may be a crucial gene involved in the defective OFT elongation in embryos collected from the obese mothers. In addition, the increase of *Perilipin 4* and *Perilipin 5* expressions in the OFT in HFD condition reinforces our hypothesis regarding the role of lipids, and certainly lipid storage, on the development of CHDs from early developmental stages.

Although, fatty acids are essential during embryonic development and are obtained from the maternal diet through placenta transport and mechanism (Haggarty, 2010) we demonstrate in the present study that the excess of fat energy is harmful to the normal development of the embryonic heart. Our study provides compelling evidence that maternal obesity, induced by a high-fat diet, significantly impacts embryonic heart development, particularly affecting the outflow tract and second heart field. The observed increase in congenital heart defects and embryonic mortality in the HFD group underscores the importance of maternal metabolic health during pregnancy. By demonstrating the accumulation of lipids in the embryonic heart and the altered expression of key lipid metabolism regulators like *Pparγ*, our findings suggest that excessive maternal lipid intake disrupts normal cardiac development. This work

highlights the need for further research into the mechanisms by which maternal obesity influences the embryonic heart development from early stages and reinforces the importance of maternal nutrition for preventing CHD.

References

Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, Wasserman DH, McGuinness OP; NIH Mouse Metabolic Phenotyping Center Consortium. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. Dis Model Mech. 2010 Sep-Oct;3(9-10):525-34. doi: 10.1242/dmm.006239. Epub 2010 Aug 16. PMID: 20713647; PMCID: PMC2938392.

Baardman ME, Kerstjens-Frederikse WS, Berger RM, Bakker MK, Hofstra RM, Plösch T. The role of maternal-fetal cholesterol transport in early fetal life: current insights. Biol Reprod. 2013 Jan 31;88(1):24. doi: 10.1095/biolreprod.112.102442. PMID: 23153566.

Cetin I, Parisi F, Berti C, Mandò C, Desoye G. Placental fatty acid transport in maternal obesity. J Dev Orig Health Dis. 2012 Dec;3(6):409-14. doi: 10.1017/S2040174412000414. PMID: 25084293.

Cryer A. The role of the endothelium in myocardial lipoprotein dynamics. Mol Cell Biochem. 1989 Jun 27-Jul 24;88(1-2):7-15. doi: 10.1007/BF00223417. PMID: 2674668.

De Bono C; C. Thellier; N. Bertrand; R. Sturny; E. Jullian; C. Cortes; S. Stefanovic; S. Zaffran; M. Theveniau-Ruissy; R. G. Kelly T-box genes and retinoic acid signaling regulate the segregation of arterial and venous pole progenitor cells in the murine second heart field*, Hum. Mol. Genet.*, Volume 27 (2018), pp. 3747-3760

Domínguez JN, Meilhac SM, Bland YS, Buckingham ME, Brown NA. Asymmetric fate of the posterior part of the second heart field results in unexpected left/right contributions to both poles of the heart. Circ Res. 2012 Oct 26;111(10):1323-35. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271247. Epub 2012 Sep 5. PMID: 22955731.

Dubé E, Gravel A, Martin C, Desparois G, Moussa I, Ethier-Chiasson M, Forest JC, Giguère Y, Masse A, Lafond J. Modulation of fatty acid transport and metabolism by maternal obesity in the human full-term placenta. Biol Reprod. 2012 Jul 19;87(1):14, 1-11. doi: 10.1095/biolreprod.111.098095. PMID: 22553224.

Gilboa SM, Correa A, Botto LD, Rasmussen SA, Waller DK, Hobbs CA, Cleves MA, Riehle-Colarusso TJ; National Birth Defects Prevention Study. Association between prepregnancy body mass index and congenital heart defects. Am J Obstet Gynecol. 2010 Jan;202(1):51.e1-51.e10. doi: 10.1016/j.ajog.2009.08.005. Epub 2009 Oct 1. PMID: 19796755.

Haggarty P. Fatty acid supply to the human fetus. Annu Rev Nutr. 2010 Aug 21;30:237-55. doi: 10.1146/annurev.nutr.012809.104742. PMID: 20438366.

Jin H, Wang H, Li J, Yu S, Xu M, Qiu Z, Xia M, Zhu J, Feng Q, Xie J, Xu B, Yang Z. Differential contribution of the two waves of cardiac progenitors and their derivatives to aorta and pulmonary artery. Dev Biol. 2019 Jun 15;450(2):82-89. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.03.019. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30951706.

Kadowaki T, Hara K, Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Yamauchi T, Eto K, Kadowaki H, Noda M, Hagura R, Akanuma Y. The role of PPARgamma in high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. J Diabetes Complications. 2002 Jan-Feb;16(1):41-5. doi: 10.1016/s1056-8727(01)00206-9. PMID: 11872365.

Kelly, R.G., Brown, N.A., Buckingham, M.E., 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. Dev Cell 1, 435-440.

Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. Cell. 2005 Dec 16;123(6):993-9. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.026. PMID: 16360030.

Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. J Cardiovasc Pharmacol. 2010 Aug;56(2):130-40. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181e74a14. PMID: 20505524.

Madsen NL, Schwartz SM, Lewin MB, Mueller BA. Prepregnancy body mass index and congenital heart defects among offspring: a population-based study. Congenit Heart Dis. 2013 Mar-Apr;8(2):131-41. doi: 10.1111/j.1747-0803.2012.00714.x. Epub 2012 Sep 12. PMID: 22967199.

Mills JL, Troendle J, Conley MR, Carter T, Druschel CM. Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study. Am J Clin Nutr. 2010 Jun;91(6):1543-9. doi: 10.3945/ajcn.2009.28865. Epub 2010 Apr 7. PMID: 20375192; PMCID: PMC2869507.

Morris JK, Springett AL, Greenlees R, Loane M, Addor MC, Arriola L, Barisic I, Bergman JEH, Csaky-Szunyogh M, Dias C, Draper ES, Garne E, Gatt M, Khoshnood B, Klungsoyr K, Lynch C, McDonnell R, Nelen V, Neville AJ, O'Mahony M, Pierini A, Queisser-Luft A, Randrianaivo H, Rankin J, Rissmann A, Kurinczuk J, Tucker D, Verellen-Dumoulin C, Wellesley D, Dolk H. Trends in congenital anomalies in Europe from 1980 to 2012. PLoS One. 2018 Apr 5;13(4):e0194986. doi: 10.1371/journal.pone.0194986. PMID: 29621304; PMCID: PMC5886482.

Persson M, Razaz N, Edstedt Bonamy AK, Villamor E, Cnattingius S. Maternal Overweight and Obesity and Risk of Congenital Heart Defects. J Am Coll Cardiol. 2019 Jan 8;73(1):44-53. doi: 10.1016/j.jacc.2018.10.050. PMID: 30621950.

Rammah M, Théveniau-Ruissy M, Sturny R, Rochais F, Kelly RG. PPARγ and NOTCH Regulate Regional Identity in the Murine Cardiac Outflow Tract. Circ Res. 2022 Oct 28;131(10):842-858. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.320766. Epub 2022 Oct 7. PMID: 36205127.

Rana MS, Théveniau-Ruissy M, De Bono C, Mesbah K, Francou A, Rammah M, Domínguez JN, Roux M, Laforest B, Anderson RH, et al. Tbx1 coordinates addition of posterior second heart field progenitor cells to the arterial and venous poles of the heart. *Circ Res*. 2014;115:790–799. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305020

Rochais, F., Mesbah, K., Kelly, R.G., 2009. Signaling Pathways Controlling Second Heart Field Development. Circ. Res. 104, 933–942.

Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Jul;90(7):4267-75. doi: 10.1210/jc.2004-2265. Epub 2005 Apr 12. PMID: 15827101.

Théveniau-Ruissy M, Dandonneau M, Mesbah K, Ghez O, Mattei MG, Miquerol L, Kelly RG (2008) The del22q11.2 candidate gene Tbx1 controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. Circ Res 103(2):142–148

Turunen R, Pulakka A, Metsälä J, Vahlberg T, Ojala T, Gissler M, Kajantie E, Helle E. Maternal Diabetes and Overweight and Congenital Heart Defects in Offspring. JAMA Netw Open. 2024 Jan 2;7(1):e2350579. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.50579. PMID: 38180757; PMCID: PMC10770771.

Van der Vusse GJ, Glatz JF, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Bassingthwaighte JB. Transport of long-chain fatty acids across the muscular endothelium. Adv Exp Med Biol. 1998;441:181-91. doi: 10.1007/978-1-4899-1928-1_17. PMID: 9781325; PMCID: PMC4121332.

van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. Cardiovasc Res. 2000 Jan 14;45(2):279-93. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00263-1. PMID: 10728348.

Figure legends

Figure 29.

Mouse model of high fat diet-induced maternal obesity.

A. Experimental plan of induced maternal obesity mouse model. Females were fed with high fat diet (HFD) for eight weeks before mating with a normal diet (ND) male. Mice were weighted weekly until sacrifice when the embryos were collected after mating and blood glucose levels were measured at weeks 0, 4, and 8 weeks (Red). **B**. Body weight measurements. Histogram representative of the weight measurements of mice on a normal diet (ND) versus a high fat diet (HFD) during the 8 weeks of diet. Comparisons are shown at 0 and 8 weeks of normal and high fat diet. After 8 weeks of HFD, the mice display a highly significant gain of weight compared to ND condition. **C**. Diabetes control. Normal and high fat diet females were controlled for blood glucose at 0 and 8 weeks of normal and high fat diet and at the sacrifice. Mice were never diagnosed as diabetic.

Figure 30.

Cardiac Malformations at E15.5 in Embryos from High-Fat Diet Mothers.

Females were fed with high fat diet (HFD) for eight weeks before mating with a normal diet (ND) male. Pregnant females were sacrificed at fetal gestation period and embryo cardiac morphogenesis was evaluated. **A**. Table of the incidence of the cardiac defects. 10% of embryos from HFD mothers were found dead at the time of the dissection. Over 70 embryos collected from HFD mothers, 87% display cardiac defects such as ventricular septal defect (VSD), compaction defect and hypertrophy. **B.** Histological analysis with eosin-stained frontal sections of embryonic hearts from control diet mothers (top left panel) and HFD mothers (other panels) reveal ventricular septal defects (VSD), impaired ventricular compaction with arrow showing the defective compaction at the RV and hypertrophy. Ao, aorta; RV, right ventricle; LV, left ventricle; PT, pulmonary trunk.

Figure 31.

Early embryonic lethality of HFD collected embryos, OFT elongation impairment.

A. Embryonic death of the ND and HFD groups of embryos at different stages, E9.5-E12.5. **B.** Left views of E10.5 embryos from the ND (left panel) and HFD (right panel), respectively. Black bars show the measured length from the distal to the proximal OFT. **C**. Histograms showing OFT measurements of E10.5 *ND and HFD embryos.* ***, p<0.001, Student T-test.

Figure 32.

Early embryonic lethality of HFD collected embryos.

A. Experimental plan of the embryo culture. E8.5 wild type embryos were cultured in rolling bottles in a precision incubator for 24h in a culture medium supplemented with fluorescent fatty acid analog Bodipy. **B.** Fatty acid uptake (Bodipy) at E9.5. Fluorescent vesicles are detected in the pharyngeal region where SHF progenitor cells are located. **C**. Section of a E9.5 embryo from the ND group stained with Oil Red O at low (left panel) and high (right panel) magnifications, respectively. Lipid droplets are enriched in the SHF and OFT (arrows). Note that lipid droplets are present in the endothelial cells of the OFT (asterisks). **D**. Oil Red O stained sections of E10.5 embryos from the ND and HFD groups, respectively. **E**. Lipid vesicles were counted on different sections of different embryos. Note the enrichment of lipid droplets in the section obtained from the embryo of the HFD group (right panel). **F**. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of Pparγ, Plin4, and Plin5 in the OFT from ND and HFD groups of embryos.SHF, second heart field; OFT, outflow tract. *, p<0.04, Student T-test.

Figure 29

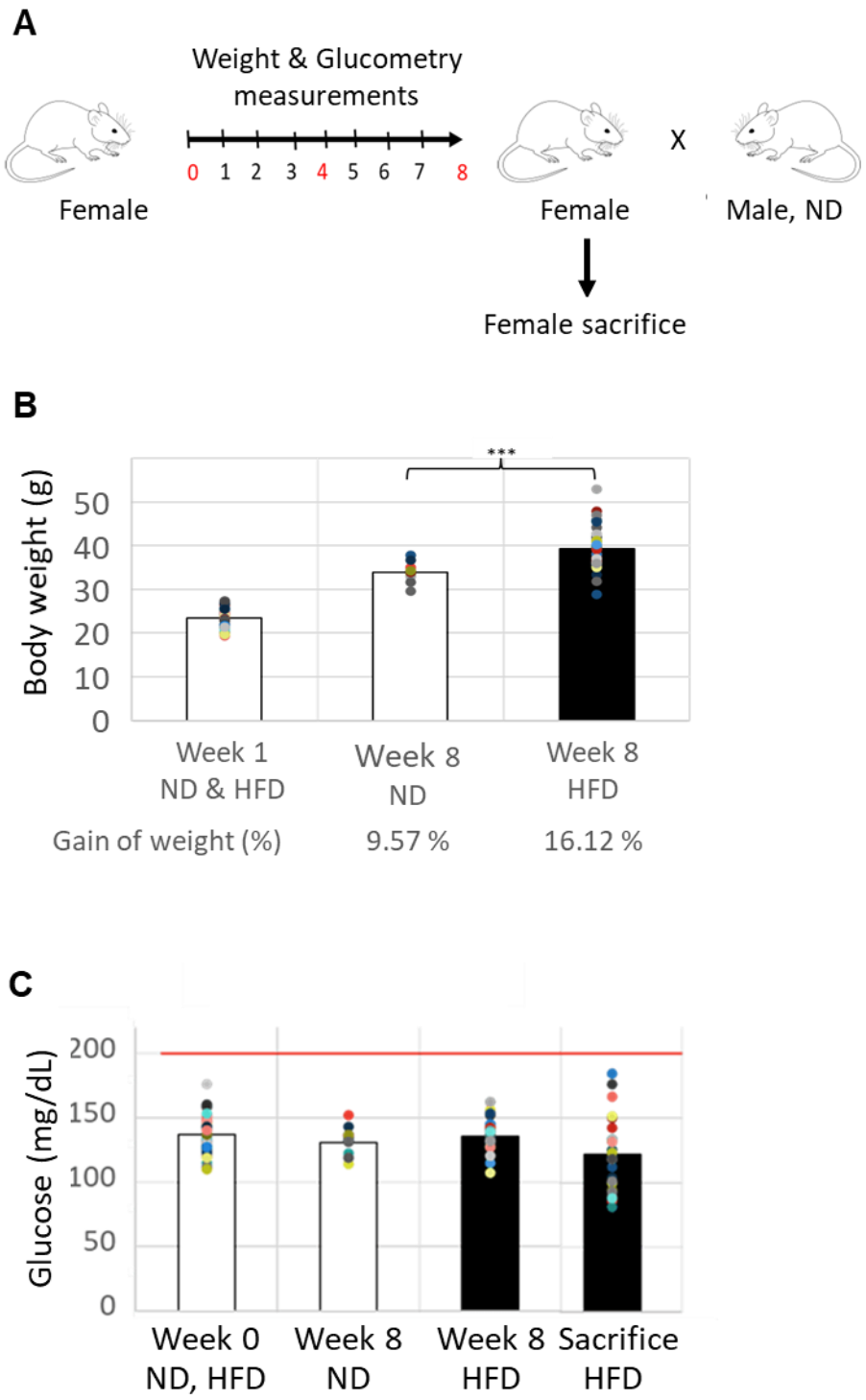

A
Weight & Glucometry measurements
0 1 2 3 4 5 6 7 8
Female
Female
X
Male, ND
Female sacrifice
B
***
Body weight (g)
0
10
20
30
40
50
Week 1 ND & HFD
Week 8 ND
Week 8 HFD
Gain of weight (%)
9.57 %
16.12 %
C
Glucose (mg/dL)
0
50
100
150
200
Week 0 ND, HFD
Week 8 ND
Week 8 HFD
Sacrifice HFD

Figure 30

A

	ND	HFD
Total	**24**	**70**
Dead (%)	**0**	**6 (10%)**
Normal (%)	**23 (96%)**	**9 (13%)**
Defective heart (%)	**1 (4%)**	**55 (79%)**
Ventricular septal defect (%)	0	8 (11%)
Compaction (%)	1 (4%)	14 (20%)
Hypertrophy (%)	0	43 (61%)

B

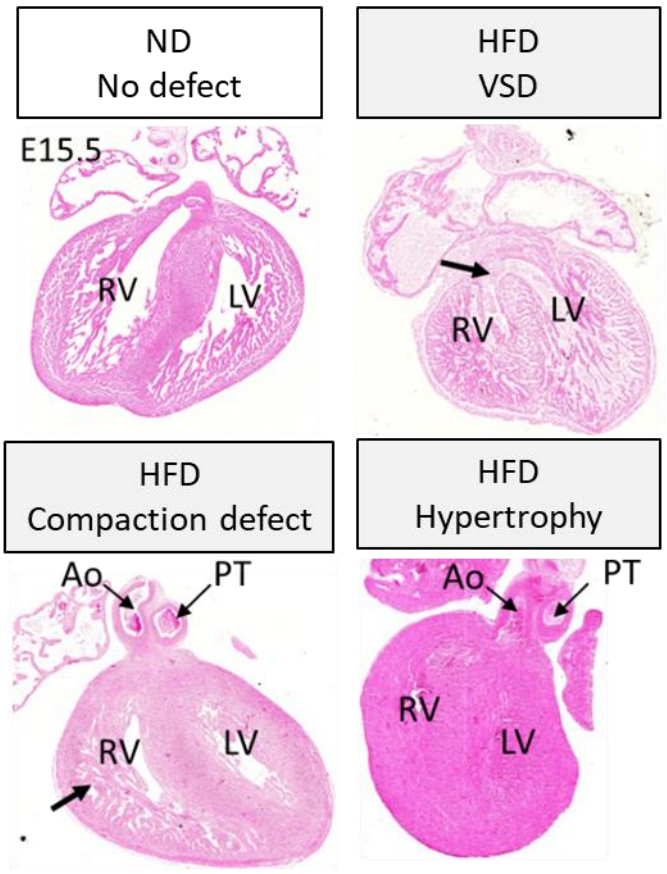
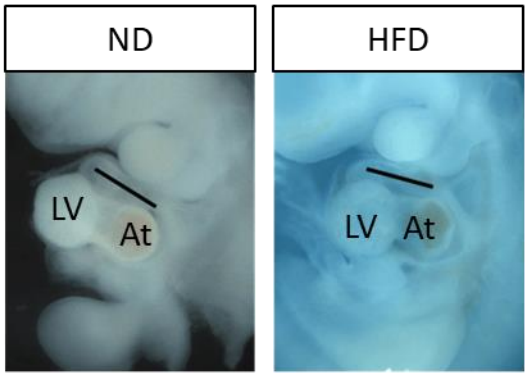


Figure 31

A

Stages	E9.5		E10.5		E11.5		E12.5		Total	
Diet	ND	HFD	ND	HFD	ND	HFD	ND	HFD	ND	HFD
Dead (%)	4 (2.9)	4 (5.4)	12 (6)	16 (20)	0 (0)	2 (18)	0 (0)	2 (8.3)	16 (4.1)	24 (12)
Total	139	74	200	80	19	11	15	24	373	200
Litter	12	6	18	5	1	1	1	2	32	15

B



C

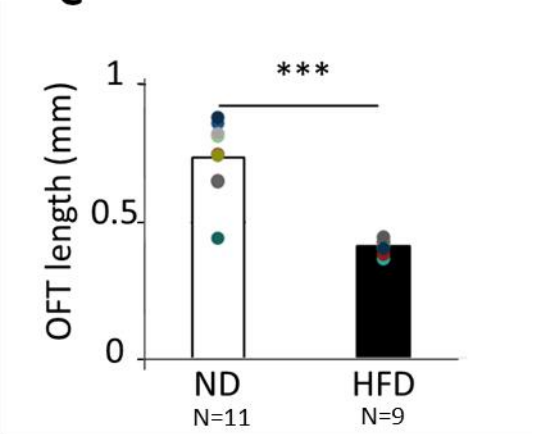
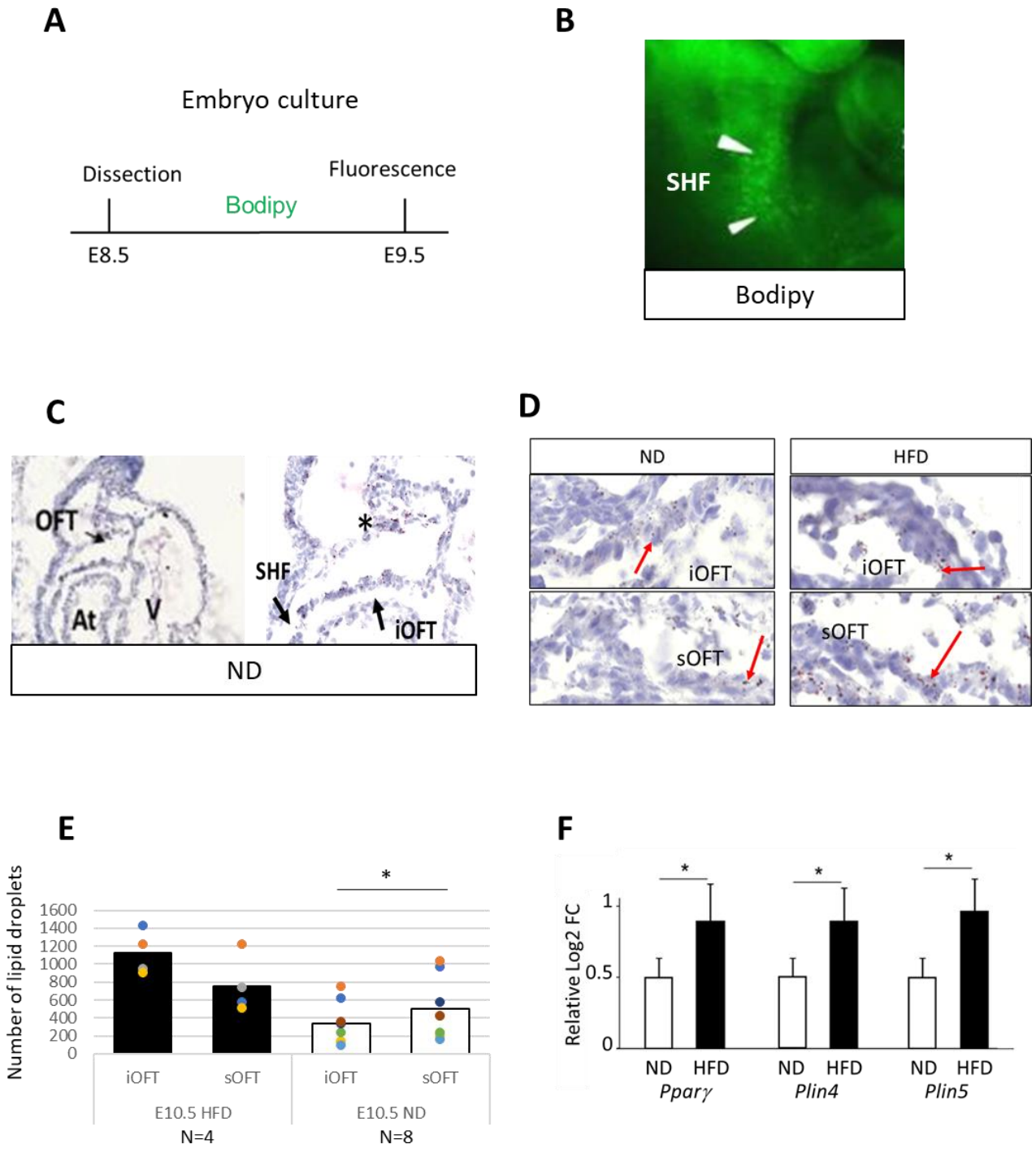


Figure 32


A
Embryo culture
Dissection
Fluorescence
Bodipy
E8.5
E9.5
B
SHF
Bodipy
C
OFT
At
V
SHF
iOFT
*
ND
D
ND
HFD
iOFT
iOFT
sOFT
sOFT
E
Number of lipid droplets
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
*
iOFT
sOFT
iOFT
sOFT
E10.5 HFD
N=4
E10.5 ND
N=8
F
Relative Log2 FC
1
0.5
0
*
*
*
ND HFD
ND HFD
ND HFD
Pparγ
Plin4
Plin5

Étude des malformations cardiaques post-natales

Cette partie de l'étude se concentre sur la compréhension du développement des malformations cardiaques en contexte post-natal. Nous avons vu précédemment que les défauts cardiaques observés chez les embryons de mère CD1 HFD au stade E15.5 montrent que 79 % d'entre eux présentent des anomalies, notamment des hypertrophies ventriculaires. De plus, les études à grande échelle ont montré une augmentation significative de la prévalence des cardiopathies congénitales sévères associées à l'obésité maternelle (Morris et al., 2018 ; Persson et al., 2019). Ces résultats suggèrent que la majorité de ces embryons vont probablement développer des altérations de la fonction cardiaque postnatales voire au stade adulte être susceptible de mener à une insuffisance cardiaque sévère et une léthalité précoce. Chez l 'Homme, bien que les malformations cardiaques liées à l'obésité maternelle soient fréquentes, la plupart des enfants atteints survivent jusqu'à l'âge adulte. Cependant, cela entraîne une mortalité élevée et une qualité de vie réduite (Abassi et al., 2020).

Pour étudier les conséquences d'un environnement riche en graisses pendant le développement embryonnaire et son impact à long terme, les souris qui sont nées dans notre étude HFD ont été placées auprès de mères ND pour l'allaitement, afin d'éviter les altérations cardiaques secondaires à un lait riche en graisses provenant de mères HFD (Mizera et al., 2022). Il est intéressant de noter qu'aucune des 8 souris n'est décédée après quatre semaines. Nous avons récupéré les cœurs de ces souris âgées de quatre semaines et effectué une étude histologique grâce à des marquages à l'éosine (**Figure 33**). Les premiers cœurs étudiés montrent une masse intraventriculaire (**Figure 33A**). Les expériences réalisées avec le Sirius Red nous ont permis d'exclure la présence de masses fibrotiques. Étant donné le contexte d'obésité et l'observation d'une accumulation de gouttelettes lipidiques chez les embryons issus de mères ayant une alimentation HFD, nous avons émis l'hypothèse que ces masses pourraient être de nature lipidique. Pour comprendre la nature de cette masse, nous avons donc réalisé des expériences d'immunofluorescence avec l'anticorps PRDM16, qui marque le tissu adipeux brun, et

l'anticorps MF20, qui marque les cellules cardiaques (**Figure 33B**). Le marquage indique que la masse intraventriculaire est une masse lipidique.

Figure 33

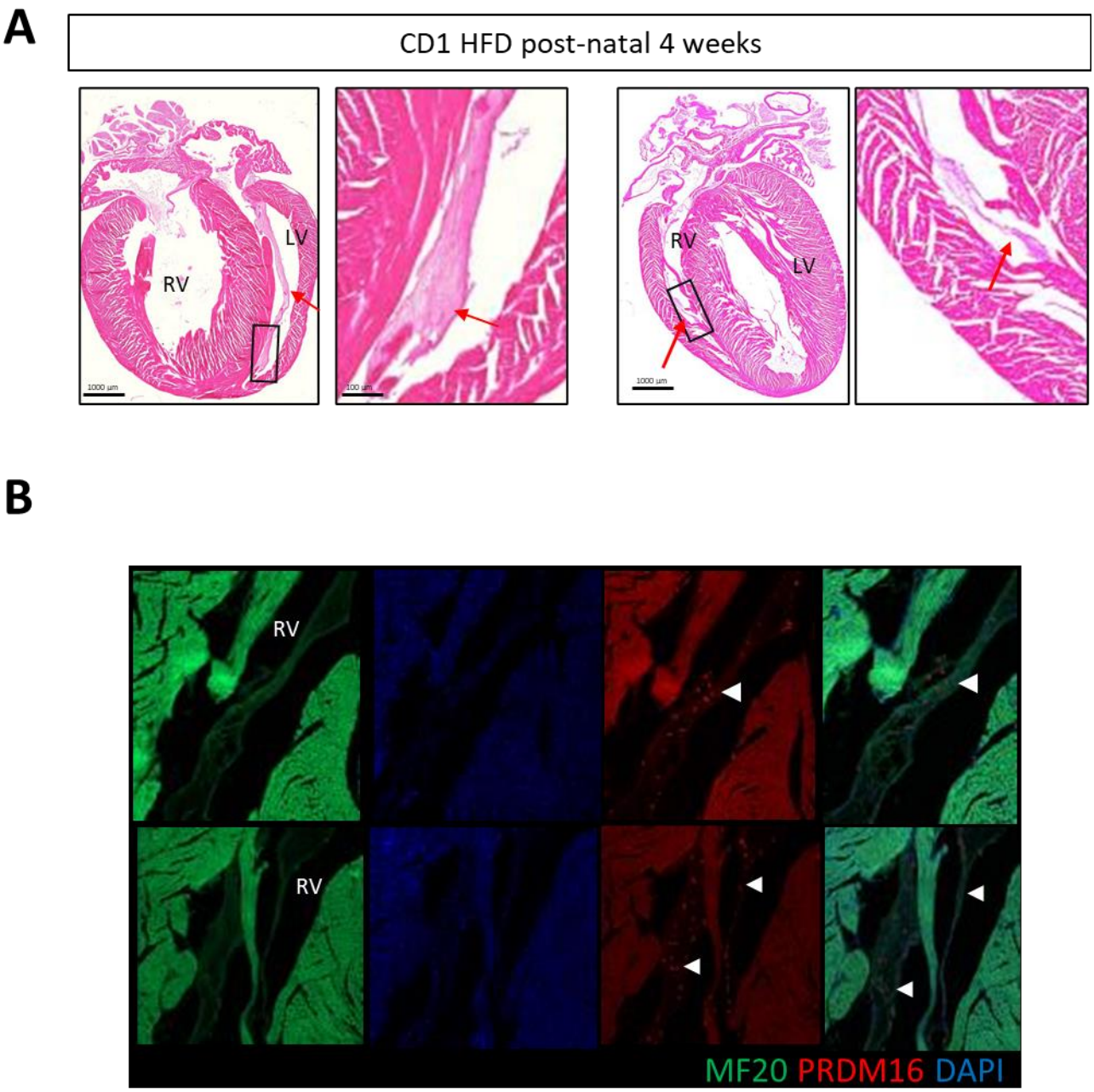


Figure 33.

Masse lipidique post-natale

A. Coupe histologique d'embryons issus de mères nourries avec un régime HFD et allaités par des mères nourries avec un régime ND. Cette coupe révèle des accumulations significatives de lipides au sein des ventricules, illustrant les effets résiduels du régime alimentaire maternel sur la composition lipidique post-natale des embryons. **B.**

Marquage par immunofluorescence de la zone encadrée dans la coupe histologique, avec le marqueur PRDM16 (en rouge) spécifiquement localisant le tissu adipeux, et le marqueur MF20 (en vert) identifiant les cellules musculaires cardiaques. Cette image permet de visualiser la distribution du tissu adipeux dans le cœur et d'étudier la relation entre les accumulations lipidiques et les structures cardiaques.

Nous avions précédemment observé qu'un environnement riche en graisses entraînait une plus grande absorption de gouttelettes lipidiques dans les régions du SHF et de l'OFT (**Figure 32**). Cette perturbation engendre des défauts cardiaques à des stades précoces du développement et des défauts irréversibles après la naissance de l'embryon. Des études à plus long terme pourraient évaluer les conséquences cardiovasculaires chez les souris adultes ayant survécu à un environnement riche en graisses pendant la période embryonnaire.

B. Résultats - Partie II

xvi. *PPARγ* et les maladies cardiaques congénitales secondaires à l'obésité maternelle

L'obésité maternelle est de plus en plus courante dans la société, avec des répercussions significatives sur la santé des enfants à naître. Le rôle des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, tels que *PPARγ* (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma), peut être crucial pour comprendre les mécanismes sous-jacents à ces anomalies. Il a été démontré que l'activation de *PPARγ* favorise non seulement la différenciation des préadipocytes résidents en adipocytes dans le tissu adipeux, mais stimule également la mobilisation des cellules progénitrices circulantes (Hausman GJ et Hausman DB, 2006). Chez les embryons humains, les cellules épicardiques des ventricules expriment naturellement *PPARγ*, ce qui explique la présence importante de tissu adipeux dans le cœur dès la naissance et tout au long de la vie (Yamaguchi et al., 2015). De plus, l'analyse des gènes enrichis dans les parois inférieure et supérieure de l'OFT met en évidence une activité de la voie de signalisation PPAR, avec notamment une augmentation de l'expression des transcrits dans l'iOFT, qui est à l'origine du myocarde à la base du

tronc pulmonaire (Rammah et al., 2022). Ce qui signifie que Pparg est impliqué dans le développement du cœur aux stades précoce et que sa fonction de senseur lipidique est donc requise pour le développement normal du cœur. C'est pour cela que notre étude se concentre sur l'impact de la suppression de *PPARγ* dans les progéniteurs cardiaques, en utilisant un modèle de souris *Mesp1-Cre;Pparγ $^{fl/fl}$* soumis à un régime riche en graisses. Nos objectifs sont de déterminer la prévalence et la nature des CHDs dans ce modèle, ainsi que de comprendre les mécanismes par lesquels l'absence de *PPARγ* exacerbe ou atténue les effets délétères de l'obésité maternelle sur le développement cardiaque embryonnaire. L'accumulation de lipides dans les tissus cardiaques embryonnaires est une caractéristique notable de l'obésité maternelle (Challier et al., 2008 ; Hochner et al., 2012). Cette accumulation peut interférer avec le développement normal du cœur et contribuer à des malformations cardiaques pouvant entrainer des facteurs de risque cardio-métaboliques (Hochner et al., 2012). L'objectif est de corréler les CHDs observées ainsi que de déterminer si la modulation de l'expression de *PPARγ* peut atténuer les effets négatifs de l'obésité maternelle sur le développement cardiaque.

Les résultats de cette recherche pourraient fournir des informations essentielles pour comprendre les mécanismes pathologiques des CHD associées à l'obésité maternelle et ouvrir la voie à des interventions thérapeutiques ciblées.

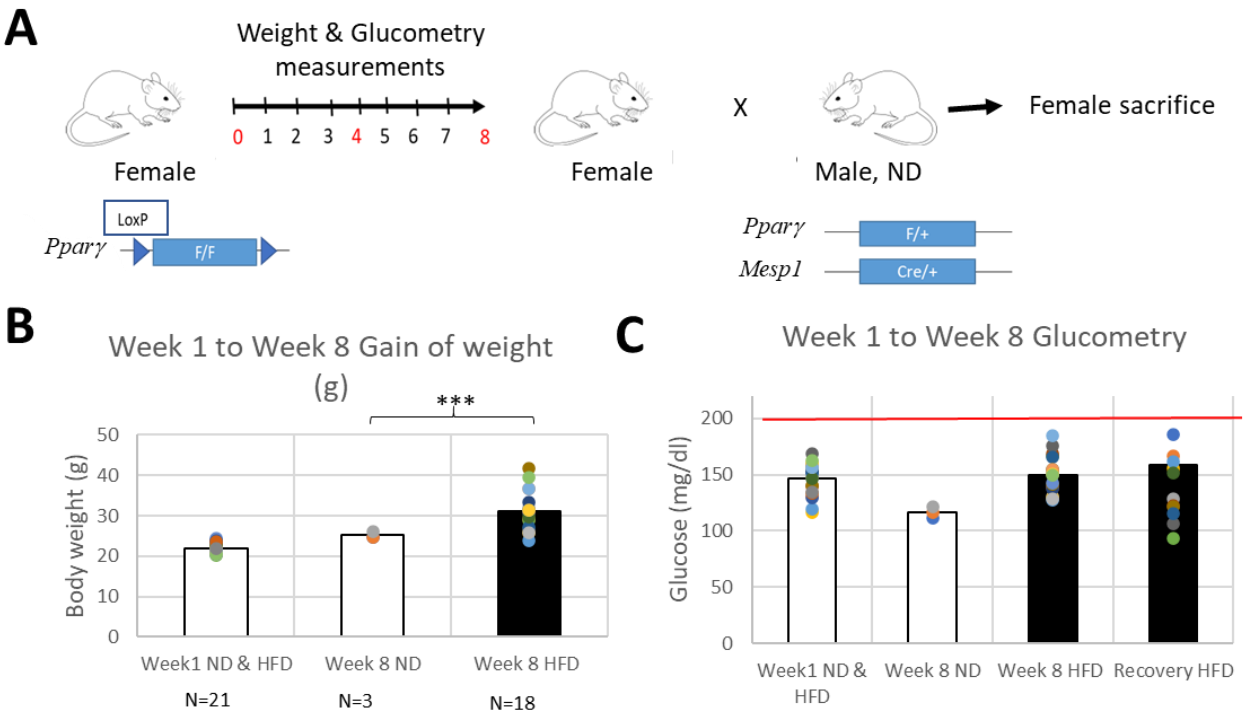
Résultats

Malformations cardiaques congénitales liées à l'obésité maternelle dans un contexte du mutant *Mesp1-Cre;Pparγ$^{fl/fl}$*

Différentes études épidémiologiques ont démontré que l'obésité maternelle est clairement associée au développement de CHD. Nous avons décidé de faire la lumière sur ce facteur de risque environnemental (Persson et al., 2017 ; Turunen et al., 2024). Pour cette étude, nous avons développé un modèle de souris *Pparγ $^{fl/fl}$* rendues obèses. Deux groupes de femelles ont été comparés, un groupe de souris témoin avec un régime alimentaire normal (ND) et un groupe expérimental de souris avec un régime alimentaire riche en graisses (HFD) comme décrit précédemment. Les souris ont été soumises à un régime riche en graisse pendant 8 semaines (**Figure 34**) avec des pesées hebdomadaires ainsi qu'au moment du sacrifice lors de la collecte des embryons. En comparant le poids des souris *Pparγ $^{fl/fl}$* nourries au HFD à celui des souris nourries au ND, on a observé une

augmentation significative du poids corporel des souris HFD (**Figure 34 B**). Etant donné que *PPARγ* est un senseur lipidique qui provoque une sensibilisation à l'insuline et améliore le métabolisme du glucose. Les souris ND et HFD ont fait l'objet d'une surveillance de la glycémie jusqu'à ce qu'elles soient sacrifiées. Après 8 semaines, aucune des souris ne s'est révélée diabétique (**Figure 34C**). Au cours du développement cardiaque, il a été démontré que l'activité de *PPARγ* était nécessaire à la formation du tissu adipeux épicardique (Yamaguchi et al., 2015). Des recherches ont révélé que l'activité de *PPARγ* est indispensable à la différenciation des cellules mésenchymateuses en adipocytes dans la région auriculo-ventriculaire du cœur. Dans des modèles murins où *PPARγ* a été inactivé de manière conditionnelle, les adipocytes matures étaient absents, bien que le mésenchyme soit toujours présent. Cela suggère que, même si *PPARγ* n'intervient pas dans la transformation mésenchymateuse initiale, il est essentiel pour que ces cellules mésenchymateuses puissent se différencier en adipocytes (Yamaguchi et al., 2015). C'est pourquoi, dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux embryons mutants pour *PPARγ* dans un contexte d'obésité maternelle. La prévalence ainsi que la nature des CHDs développés chez les embryons issus des accouplements entre les femelles Pparγ^{fl}/^{fl} HFD et ND avec des mâles *Pparγ* ^{fl}/$^{+}$; *Mesp1*cre ont été étudiés. (**Figure 34 D**) Ainsi, nous avons pu obtenir les différents génotypes attendus : Mesp1-Cre, *Pparγ* ^{fl}/^{fl} ; Mesp1-Cre, *Pparγ* ^{fl}/$^{+}$; Mesp1-WT, *Pparγ* ^{fl}/^{fl} ; Mesp1-WT, *Pparγ* ^{fl}/$^{+}$.

Figure 34



D

Fond Génétique	Janvier Labs	répartition mendélienne	Charles Rivers	répartition mendélienne
Total E15.5	**112**	**112**	**71**	**71**
Pparγ $^{fl/fl}$; Mesp1 Cre	39 (35%)	28	18 (25%)	18
Pparγ $^{fl/+}$; Mesp1 Cre	29 (25%)	28	10 (14%)	18
Pparγ $^{fl/fl}$; Mesp1 WT	22 (20%)	28	24 (34%)	18
Pparγ $^{fl/+}$; Mesp1 WT	22(20%)	28	19 (27%)	18

E

Stages	E9.5		E10.5		E15.5		Total	
Diet	**ND**	**HFD**	**ND**	**HFD**	**ND**	**HFD**	**ND**	**HFD**
Dead (%)	1 (3)	2 (7)	6 (14)	3 (11)	0 (0)	11 (10)	7 (6,4)	16 (9,5)
Total	33	29	43	28	33	111	109	168
Litter	3	3	5	3	4	12	12	18

Figure 34

Modèle de souris mutant *Mesp1-Cre; Pparγ $^{fl/fl}$*.

A. Les femelles *Pparγ $^{fl/fl}$* ont été soumises à un régime riche en graisses pendant 8 semaines. La glycémie a été mesurée aux semaines 0, 4 et 8. Elles ont ensuite été accouplées avec des mâles *Pparγ $^{fl/+}$; Mesp1*cre **.B**. L'analyse de la prise de poids montre que les souris HFD ont pris significativement plus de poids que les souris témoins ND

après 8 semaines. **C**. Les graphiques de glycémie à la semaine 1, à la semaine 8 et le jour du sacrifice montrent que les souris n'ont pas développé de diabète malgré le régime riche en graisses. **D**. Répartition des embryons HFD collectés en fonction de leurs génotypes. Les tableaux des dissections montrent une répartition non mendélienne. **E.** Pourcentage d'embryon ND et HFD résorbés à différent stade du développement.

Nous avons réalisé ces expériences sur le fond génétique CD1 non consanguin. Les souris *Pparγ*$^{fl/+}$ ont été accouplées avec des animaux de fond génétique CD1 obtenus de l'élevage Charles River (noté CR) et de l'élevage Janvier Lab (noté JL), cette lignée de souris non-consanguine présente des variabilités génétiques (**Figure 34 D**). Il est bien établi que le fond génétique peut influencer de manière significative les résultats expérimentaux, comme le souligne Vaillant et ses collaborateurs (2014). En effet, les variations génétiques entre individus ou lignées peuvent introduire des différences notables dans la manière dont les organismes réagissent à des traitements ou à des conditions expérimentales spécifiques. De façon intéressante, nous avons pu noter que les proportions d'embryons observées ne respectent pas les lois de la génétique mendélienne classique. Des écarts significatifs entre les animaux issus des différents croisements suggèrent une variation non-mendélienne des génotypes parmi les embryons étudiés. Selon ces lois, on s'attendrait à voir des proportions spécifiques de chaque génotype, basées sur la ségrégation indépendante des allèles et la dominance des traits. Concrètement, la proportion d'embryons *Pparγ* $^{fl/fl}$; *Mesp1*-Cre est de 35%, bien au-dessus du 25% attendu, dans le cas de croisements effectués avec des animaux CD1 de fond génétique non-consanguin JL . De même, les autres génotypes présentent des proportions différentes de ce que la génétique mendélienne prédirait. De la même façon, les embryons collectés de femelles consanguines C57Bl6 CR rendues obèse présentent également une distribution non-mendélienne des génotypes. Les différences de distribution des différents génotypes en fonction des fonds génétiques dont ils sont issus suggère que le fond génétique peut influencer la ségrégation des allèles et l'expression des gènes de manière non mendélienne (Bernstein et al., 2010 ; Vaillant et al., 2014). Plus précisément, il est possible que des facteurs génétiques ou épigénétiques propres aux lignées de souris élevées modifient la manière dont les allèles *Pparγ* et *Mesp1* sont transmis aux embryons. Par exemple, des variations dans des éléments régulateurs, des mutations modificateurs, ou des différences dans l'environnement épigénétique des embryons pourraient

expliquer pourquoi les proportions observées dévient des attentes mendéliennes classiques. Ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte la variabilité génétique et environnementale dans l'interprétation des expériences génétiques.

Les variations non mendéliennes observées sur tous génotypes confondus, suggèrent la possibilité que certains embryons meurent à des stades embryonnaires plus précoces, comme cela a été constaté précédemment chez les souris CD1 (Bernstein et al., 2010 ; Vaillant et al., 2014). Pour explorer cette hypothèse, nous avons donc prélevé des embryons JL aux stades E9.5 et E10.5 et comparé le taux de mortalité chez les embryons « tous génotypes confondus » issus de mère normales (ND) et rendus obèse (HFD). Comme démontré précédemment chez les souris CD1 sauvage (**Figure 31**), le pic de mortalité embryonnaire survientau stade E10.5, avec ici, une mortalité de 11 % chez les embryons provenant de mère JL soumis à un régime riche en graisses, contre 14 % chez ceux provenant de mère ND. Une mortalité plus élevée est observée chez les embryons ND (**Figure 34E**). La différence de mortalité entre les embryons provenant de mères HFD ou ND est notable. Un régime riche en graisses est connu pour influencer divers aspects du développement embryonnaire, y compris l'implantation, la croissance et la viabilité des embryons. Cependant, ce qui est surprenant ici, c'est que les embryons issus de mères ND présentent une mortalité plus élevée (14%) par rapport à ceux issus de mères sous HFD (11%). Ces résultats encouragent une exploration plus poussée des interactions entre génétique, nutrition et développement embryonnaire. Le modèle murin d'induction de l'obésité HFD que nous avons mis au point s'est avéré adapté à une étude plus approfondie de l'impact de l'obésité maternelle sur le développement des maladies coronariennes en l'absence de diabète.

L'incidence de l'obésité maternelle sur le développement des CHDs, dans les différents fonds génétiques a été étudiée (**Figure 35**) (Hausman GJ et Hausman DB, 2006 ; Yamaguchi et al., 2015). Dans un premier temps, les cœurs ont été prélevés sur des embryons au stade fœtal à E15.5, période critique où la septation des ventricules est achevée. L'analyse histologique des cœurs prélevés dans le groupe HFD (CR) (**Figure 35A**) a révélé que 86% des embryons témoins *Pparγ$^{fl/fl}$; Mesp1-WT* présentaient des défauts cardiaques, tels que des ventricules droit à double entrée (DORV) (14%) et des défauts de compaction (71%). En revanche, chez les mutants *Pparγ$^{fl/fl}$; Mesp1-cre*, le

pourcentage de défauts cardiaques diminue à 57%. Chez les mutants conditionnels, seuls les défauts de compaction (57%) sont observés (**Figure 35B**). De manière intéressante, les souris avec un fond génétique (JL) (**Figure 35C**) montrent des résultats similaires, avec 91% de défauts cardiaques chez les souris témoins *Pparγ ^{fl}/^{fl}; Mesp1-WT* et seulement 60% chez les embryons mutants *Pparγ ^{fl}/^{fl}; Mesp1-Cre*. De plus, le pourcentage de cœurs qui présentent des parois ventriculaire de type hypoplasique semble être plus élevé chez les souris mutantes *Pparγ^{fl}/^{fl};Mesp1-cre* de JL (15%) comparé aux souris de Charles River (**Figure 35A-C-D**). En conclusion, les résultats qui ont été obtenus avec les souris issues des deux fonds génétiques permettent de proposer que la suppression du gène *Pparγ* dans un contexte d'obésité maternelle pourrait prévenir des défauts cardiaques congénitaux, ce qui pourrait expliquer la diminution de la mortalité à E10.5 chez les embryons HFD (**Figure 34E**).

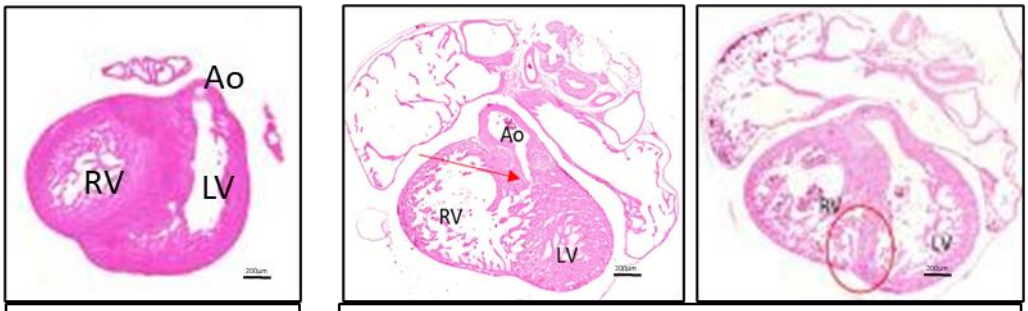
Figure 35

A

Fond génétique Charles River Laboratories E15.5	Mutant		Control	
	Ppary $^{fl/fl}$ ***; Mesp1 Cre***	***Ppary*** $^{fl/+}$ ***; Mesp1 Cre***	***Ppary*** $^{fl/fl}$	***Ppary*** $^{fl/+}$
Total	**7**	**5**	**7**	**7**
Normal (%)	**3 (43%)**	**1 (20%)**	**1 (14%)**	**0**
Defective heart (%)	**4 (57%)**	**4 (80%)**	**6 (86%)**	**7 (100%)**
Double outlet ventricule (%)	0	0	1 (14%)	0
Compaction (%)	4 (57%)	4 (80%)	5 (71%)	5 (71%)
Thin wall (%)	0	3 (60%)	3 (43%)	3 (43%)

B

Pparg $^{fl/fl}$



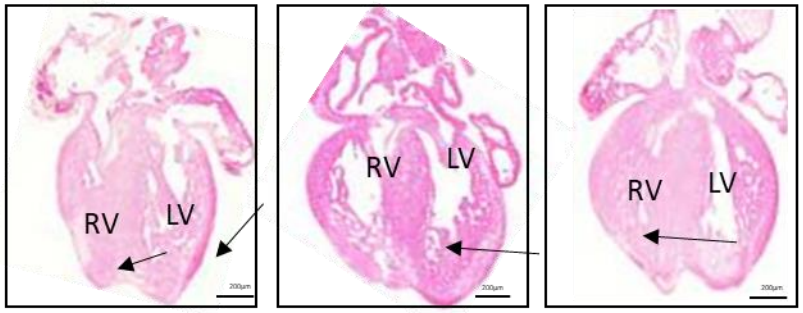
Normal heart | Double outlet right ventricle (DORV)

C

Fond génétique Janvier Laboratories E15.5	Mutant		Control	
	Ppary $^{fl/fl}$ ***; Mesp1 Cre***	***Ppary*** $^{fl/+}$ ***; Mesp1 Cre***	***Ppary*** $^{fl/fl}$	***Ppary*** $^{fl/+}$
Total	**20**	**11**	**9**	**11**
Normal (%)	**8 (40%)**	**3 (27%)**	**1 (9%)**	**1 (9%)**
Defective heart (%)	**12 (60%)**	**8 (73%)**	**8 (91%)**	**10 (91%)**
Dead (%)	0	1 (9%)	0	0
Compaction (%)	8 (40%)	6 (55%)	8 (89%)	10 (91%)
Thin wall (%)	3 (15%)	3 (28%)	4 (44%)	2 (18%)
Hypertrophy (%)	4 (20%)	1 (9%)	0	0

D

HFD *Mesp1* ^{Cre}*; Ppary* $^{fl/fl}$



White mass | Thin wall | Hypertrophy

Figure 35 : Malformations cardiaques à E15.5 chez les embryons provenant de mères HFD de fonds génétiques différents.

A-B) Fonds Génétique C57BL6 consanguin. **A**- Incidence des malformations cardiaques : le tableau montre que 86% des embryons contrôles *Pparγ^{fl}/^{fl}* présentent des défauts cardiaques contre 57% chez les mutants *Pparγ^{fl}/^{fl};Mesp1-cre*. B- Analyse histologique des coupes colorées à l'éosine de cœurs embryonnaires, montrant un cœur normal ainsi qu'un cœur présentant une transposition de l'aorte et du tronc pulmonaire (DORV). **C-D**) Fonds Génétique CD1 non-consanguin. **A**- Incidence des malformations cardiaques : le tableau montre que 91% des embryons contrôles *Pparγ^{fl}/^{fl}* présentent des défauts cardiaques contre 60% chez les mutants *Pparγ^{fl}/^{fl};Mesp1-cre*. **B**- Analyse histologique des coupes colorées à l'éosine de cœurs embryonnaires, mettant en évidence des masses blanches dans les parois cardiaques, des parois cardiaques minces, ainsi que des hypertrophies ventriculaires. Ao, aorte ; RV, ventricule droit ; LV, ventricule gauche.

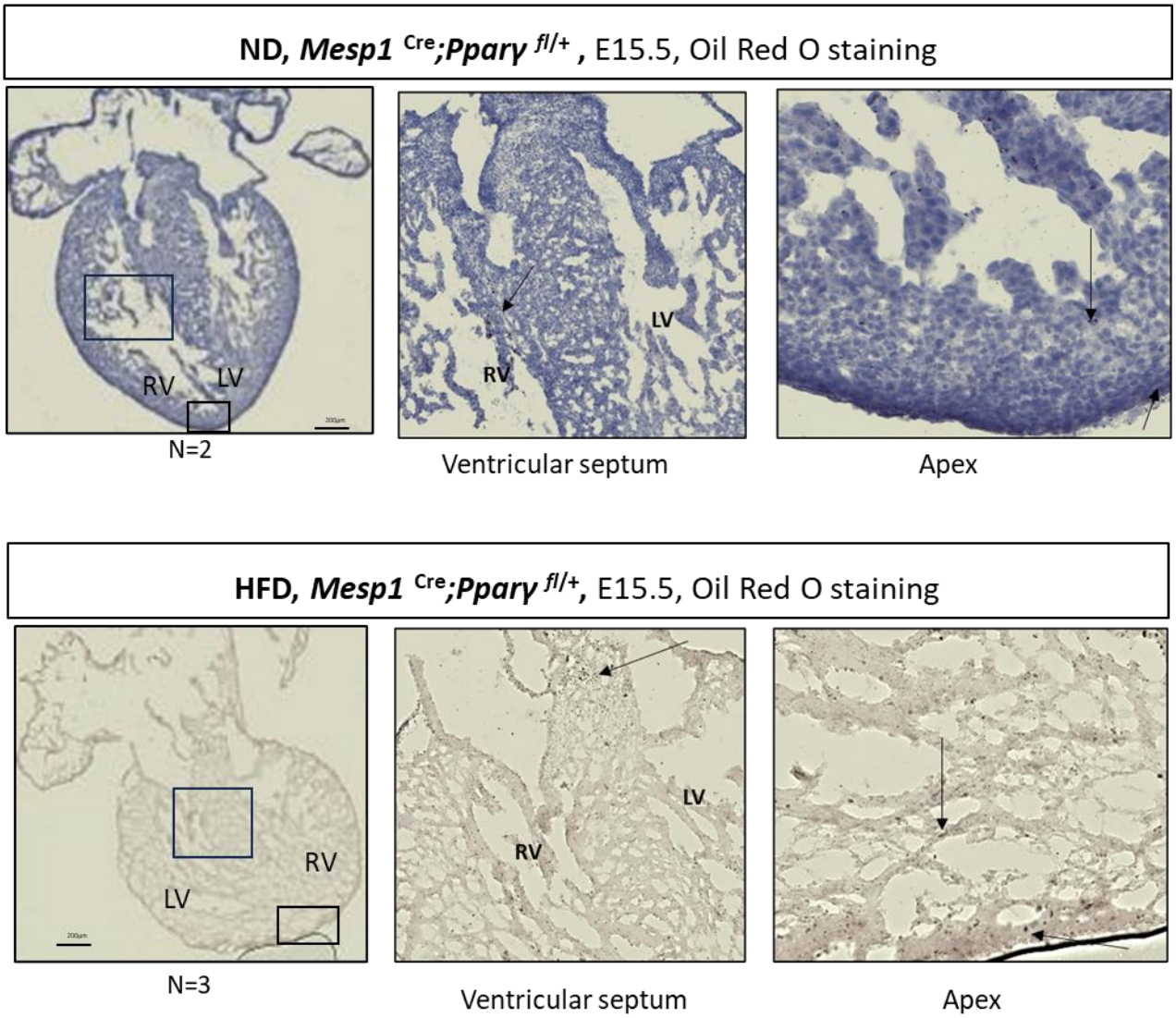
Malformations cardiaques congénitales liées à l'accumulation de lipide

Les lipides circulants, tels que le cholestérol, les triglycérides, et les lipoprotéines et les adiponectine sont des facteurs de risques majeurs pour les maladies cardiovasculaires. Bien que le fœtus produise lui-même la majeure partie de son cholestérol, principalement par le foie, il dépend fortement du cholestérol maternel au cours des premières semaines de vie, lorsque la formation des organes est en cours. Le cholestérol maternel traverse les membranes placentaires pour pénétrer dans la circulation fœtale (Lin et al., 1977). Les maladies qui affectent le taux de cholestérol maternel pourraient avoir des effets négatifs sur le développement et la croissance fœtale et présente un risque accru d'anomalies congénitales (Stothard et al., 2009 ; Persson et al., 2017 ; Persson et al., 2019 ; Turunen et al., 2024). Pour confirmer l'hypothèse qu'un environnement riche en graisses pourrait influencer l'absorption des lipides dans le cœur embryonnaire au stade fœtal, nous avons examiné des cœurs d'embryons JL à un stade gestationnel de E15.5, issus de mères alimentées avec un régime riche en graisses (HFD) ou normal (ND). Nous avons réalisé la coloration Oil Red O, qui permet de repérer les gouttelettes lipidiques dans les tissus (**Figure 36**). Les données préliminaires qui ont été obtenus de cœurs obtenus de mères

ND (n=2) et HFD (n=3) tous génotypes confondus, suggère la présence de gouttelette lipidique dans la région de l'apex et du septum ventriculaire (**Figure 36A**). Il est intéressant de noter que les sections colorées à l'éosine présentent des masses blanches (**Figure 35D**). Les masses que nous avons observées sont une accumulation de lipides dans la paroi du cœur, avec 25% des cœurs mutants *Pparγ$^{fl/fl}$;Mesp1-cre* présentant des parois avec des masses blanches lipidiques, contre 9% chez les cœurs témoins *Pparγ$^{fl/fl}$* (**Figure 36B**). En conclusion, les données préliminaires montrent une accumulation accrue de gouttelettes lipidiques dans l'apex et le septum ventriculaire des cœurs embryonnaires, avec 25 % des cœurs mutants présentant des masses blanches lipidiques, contre seulement 9 % chez les cœurs témoins. Ces résultats suggèrent une influence significative du régime alimentaire sur l'accumulation lipidique cardiaque.

Figure 36

A



B

HFD E15.5	Mutant		Control	
	Pparγ fl/fl ; Mesp1 Cre	*Pparγ fl/+ ; Mesp1 Cre*	*Pparγ fl/fl*	*Pparγ fl/+*
Total	**20**	**11**	**9**	**11**
Lipid(%)	5 (25%)	3 (27%)	1 (9%)	2 (18%)

Figure 36

Marquage Oil Red O sur les cœurs à E15.5.

A. Le marquage met en évidence les gouttelettes lipidiques dans deux régions distinctes du cœur. Les flèches indiquent ces gouttelettes lipidiques. **B.** Tableau récapitulatif de la présence de lipides dans les embryons HFD au stade E15.5.

Dans un contexte métaboliquement altéré, comme dans certaine maladie, l'activation de *PPARγ* active les paramètres métaboliques, tandis que chez les individus en bonne santé, sa régulation négative présente des effets anti-obésité (Garcia-Fuentes et al., 2010). Un régime riche en graisses entraîne une augmentation de l'expression de *PPARγ* chez les sujets sains, mais une diminution chez les personnes souffrant d'obésité morbide (Garcia-Fuentes et al., 2010). De plus, des études suggèrent que les modèles de méthylation du gène *PPARγ* peuvent être influencés par la nutrition maternelle pendant la grossesse, ce qui pourrait avoir des répercussions métaboliques à long terme chez la progéniture. Chez l'homme, au stade embryonnaire, les cellules épicardiques ventriculaires expriment naturellement *PPARγ*, ce qui explique l'abondance de tissu adipeux observée dans le cœur dès la naissance et tout au long de la vie (Yamaguchi et al., 2015). Nous avons donc procédé à l'analyse des nouveau nés issus de nos croisements JL pour étudier la survie postnatale des souris issues des mères rendues obèses. Ainsi, les embryons qui ont été menés à terme ont été utilisés pour approfondir notre compréhension de l'impact des défauts cardiaques sur le développement et la survie embryonnaire (**Figure 37**). Il est intéressant de noter que la plupart de ces embryons sont décédés avant l'âge d'une semaine avec 35% de mortalité tous génotypes confondus (**Figure 37A**). La mortalité des nouveau-nés semble être plus importante chez les souris $Ppar\gamma^{fl/+}$ avec près de 67% de mort et les souris $Ppar\gamma^{fl/+}$; *Mesp1-cre* qui comptabilise 33% de mortalité. A nouveau la délétion de *Pparγ* semble protéger contre les défauts cardiaques et donc la mortalité. Cette protection pourrait être due à l'élimination des effets délétères du gène *Pparγ* sur le développement cardiaque en condition HFD. L'analyse des cœurs de 28 embryons, tous génotypes confondus, a révélé des anomalies de septation des oreillettes (ASD) ainsi qu'une importante masse de sang retenue dans les ventricules, les oreillettes et les grandes artères après coloration à l'éosine (**Figure 37B-C**). Ces résultats soulignent l'impact de l'obésité sur le développement cardiaque. De manière surprenante, ces défauts ont été observés chez tous les embryons, qu'ils soient mutants ou témoins de l'étude. En outre, il a été constaté qu'une quantité importante de masse lipidique

intraventriculaire qui était présente dans les cœurs postnataux, notamment chez les spécimens *Pparγ $^{fl/fl}$* (86%) et *Pparγ$^{fl/fl}$; Mesp1-cre* (83%) de cœurs contenant des lipides (**Figure 37D**). Ces observations suggèrent qu'une alimentation riche en graisses durant le développement embryonnaire altérerai l'expression du gène *PPARγ*, qui joue un rôle dans la régulation du stockage et de la dégradation des graisses. Lorsque l'expression de *PPARγ* est diminuée, le métabolisme lipidique est perturbé, ce qui peut conduire à une accumulation de lipides non métabolisés dans les tissus cardiaques. Ce phénomène peut être particulièrement délétère, car une accumulation de lipides dans le cœur peut engendrer des dysfonctions cardiaques en perturbant la structure et la fonction des cellules cardiaques.

Figure 37

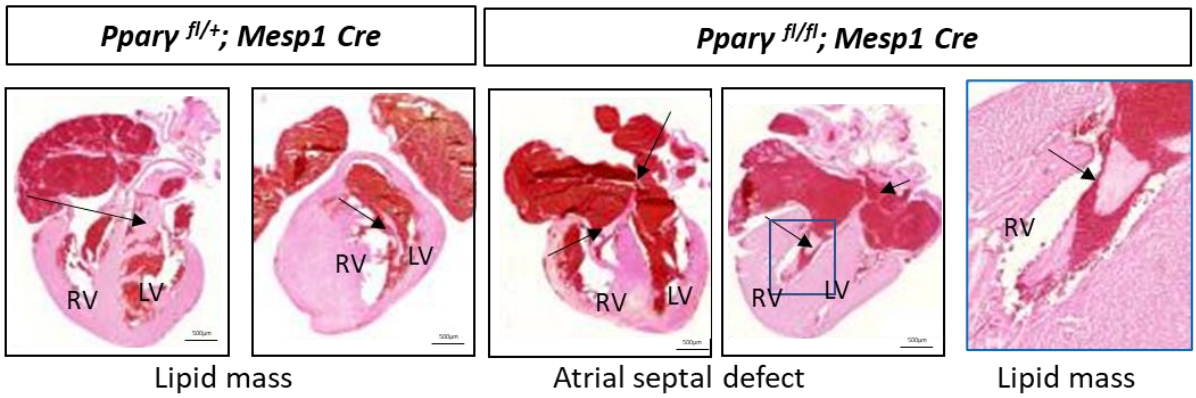
A

Post natal P0 à P3	*Ppary fl/fl ; Mesp1 Cre*	*Ppary fl/+ ; Mesp1 Cre*	*Ppary fl/fl*	*Ppary fl/+*	*Total*
Dead (%)	2 (25%)	6 (33%)	2 (25%)	4 (67%)	**14 (35%)**
Total	8	18	8	6	40

B

Post natal P0 à P3	Mutant		Control	
	Ppary fl/fl ; Mesp1 Cre	*Ppary fl/+ ; Mesp1 Cre*	*Ppary fl/fl*	*Ppary fl/+*
Total	**6**	**10**	**7**	**5**
Normal (%)	0	0	1	0
Defective heart (%)	**6 (100%)**	**10 (100%)**	**6 (86%)**	**5 (100%)**
Dead (%)	**2 (33%)**	**6 (60%)**	**2 (29%)**	**4 (80%)**
VSD/ ASD (%)	3 (50%)	4 (40%)	0	3 (60%)
Compaction (%)	5 (83%)	7 (70%)	3 (43%)	2 (40%)
Thin wall (%)	3 (50%	4 (40%)	1 (14%)	0
Hypertrophy (%)	1 (17%)	1 (10%)	2 (29%)	0

C



D

Jackson Lab E15.5 HFD	Mutant		Control	
	Ppary fl/fl ; Mesp1 Cre	*Ppary fl/+ ; Mesp1 Cre*	*Ppary fl/fl*	*Ppary fl/fl*
Total	**20**	**11**	**9**	**11**
Masses Lipidiques(%)	5 (25%)	3 (27%)	1 (9%)	2 (18%)

Figure 37

Malformations cardiaques post natale.

A. Le tableau résume la viabilité desembryons, sont indiqués le nombre total d'embryons vivants et décédés. **B-C.** Incidence des malformations cardiaques et analyse histologique des coupes colorées à l'éosine. **D**. Tableau récapitulatif de la présence de lipides dans les cœurs postnataux. RV, ventricule droit ; LV, ventricule gauche ; ASD, Atrial septal defect ; VSD, Ventricular septal defect.

Conclusion

Les résultats de cette étude soulignent l'impact significatif de l'obésité maternelle sur le développement des malformations cardiaques congénitales chez les embryons de souris. Chez l'Homme ainsi que chez différentes espèces animales, *PPARγ* est exprimé dès les stades embryonnaires précoces ce qui suggère que *PPARγ* est essentielle pour le développement (Marchington et al 1989). *PPARγ* n'est pas seulement impliqué dans la différenciation des adipocytes, *PPARγ* joue également un rôle dans la fonction des cellules matures. Principalement, *PPARγ* est un acteur clé dans le stockage des lipides dans le tissu adipeux blanc (Way et al., 2001). Au cours du développement cardiaque, il a été démontré que l'activité de *PPARγ* est nécessaire à la formation du tissu adipeux épicardique (Yamaguchi et al., 2015).

En utilisant un modèle de souris mutantes *Mesp1-Cre;Pparγ $^{fl/fl}$*, nous avons observé des variations notables dans les proportions des génotypes et des anomalies cardiaques, influencées par l'obésité maternelle induite par un régime alimentaire riche en graisses.

Nous avons réalisé ces expériences sur deux fonds génétiques différents. Les souris *Pparγ $^{fl/+}$* ont été accouplées avec des animaux de fond génétique C57Bl6 obtenus de ou avec des animaux de fonds génétiques CD1. Les proportions des génotypes issus des croisements diffèrent significativement entre les souris ayant des fonds génétiques différents. Ainsi, il y a une variation non-mendélienne potentielle qui peut certainement être attribuée aux différences des différents fonds génétiques. Les souris de fond génétique C57Bl6 montrent une mortalité embryonnaire plus élevée et des proportions différentes de génotypes par rapport à celles de fond génétique CD1 (Bernstein et al., 2010 ; Vaillant et al., 2014). Ces variations soulignent l'importance à considérer le fond génétique lors de l'interprétation et la comparaison des résultats d'études publiés.

Nos résultats indiquent que l'obésité maternelle, induite par un régime HFD, augmente le poids corporel des souris et influence directement le développement cardiaque des embryons. Les embryons issus de mères obèses montrent une augmentation des défauts cardiaques, notamment des ventricules droits à double sortie et des défauts de compaction. De manière intéressante, la suppression du gène *Pparγ* dans les progéniteurs cardiaques précoces semble atténuer certains de ces défauts, réduisant ainsi la fréquence des malformations cardiaques chez les embryons mutants par rapport aux témoins. La mortalité embryonnaire est comme précédemment augmentée entre les stades E10.5 et E11.5. Toutefois, une mortalité plus importante est à noter chez les souris ND avec 14% de mortalité. Le régime riche en graisses semble entraîner une modulation de l'expression de *Pparγ*, ce qui pourrait se traduire par une régulation altérée du métabolisme des lipides. Cette modulation peut conduire à une modification des niveaux de méthylation des gènes associés à *PPARγ*, soit en augmentant, soit en réduisant la méthylation. Les résultats publiés par Malodobra-Mazur (2019) démontrent que la méthylation des promoteurs de gènes, notamment celui de *PPARγ*, est altérée par un régime riche en graisses et par l'acide palmitique. Une méthylation réduite pourrait favoriser une expression accrue de *PPARγ*, amplifiant ainsi le stockage des lipides dans les tissus cardiaques. Inversement, une méthylation accrue pourrait réprimer l'expression de *PPARγ*, perturbant le métabolisme lipidique et contribuant aux anomalies observées (Garcia-Fuentes et al., 2010).

L'accumulation de lipides dans les cardiomyocytes de la parois cardiaque, observée plus fréquemment chez les embryons mutants provenant de fond génétique C57Bl6, suggère que l'obésité maternelle pourrait perturber le métabolisme lipidique embryonnaire, contribuant ainsi aux malformations cardiaques. La coloration Oil Red O a confirmé la présence de gouttelettes lipidiques dans les tissus cardiaques, renforçant l'idée que l'environnement riche en graisses des mères obèses affecte l'absorption et le stockage des lipides chez les embryons. Les embryons mutants et témoins ont montré une mortalité significative de 35% avant l'âge d'une semaine, avec une mortalité particulièrement élevée chez les souris *Pparγ* $^{fl/+}$. Ces résultats mettent en évidence l'impact critique des anomalies cardiaques, en particulier la présence de masses lipidiques intraventriculaires,

sur la survie embryonnaire et postnatale. Ainsi, une exposition prolongée à un environnement HFD entraîne des malformations irréversibles à long terme.

xvii. Régulation du statut métabolique des cellules progénitrices cardiaques dans le développement normal

Introduction

Le cœur est l'un des principaux consommateurs d'énergie du corps en raison de son activité incessante et rythmique de pompage du sang dans tout le système circulatoire. Les propriétés contractiles cardiaques reposent principalement sur des mécanismes moléculaires impliquant des ATPases (réticulum sarcoplasmique/endoplasmique $Ca2^{+}$, ATPase et myosine ATPase notamment) qui nécessitent une production d'énergie adaptée puisque les cardiomyocytes stockent des molécules de phosphate à haute énergie; c'est-à-dire que l'adénosine triphosphate (ATP) et la phosphocréatine ne peuvent assurer la contraction cardiaque que pendant quelques secondes seulement. La production d'ATP dans le cardiomyocyte des cœurs adulte repose fortement sur la fonction oxydative mitochondriale, qui fournit 90 % à 95 % des molécules d'énergie issues de l'oxydation des substrats susmentionnés. Les 5 % à 10 % restants sont produits par la voie de la glycolyse anaérobie, dégradant le glucose en pyruvate (Piquereau et al., 2021). Cette étude se concentre sur la régulation de la respiration mitochondriale dans les cellules cardiaques durant les premiers stades du développement embryonnaire, en mettant en lumière les différences observées entre la respiration des ventricules et des OFT en conditions normales. Les mitochondries jouent un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire en fournissant l'énergie nécessaire à la croissance et au développement des cellules. Au stade de E9.5, les mitochondries sont fragmentées, rondes et dilatées, avec peu de crête et une membrane mitochondriale moins polarisée. À mesure que l'embryon évolue vers E13.5, les mitochondries deviennent plus allongées et ramifiées, formant des

réseaux fins et interconnectés dans les mitochondrie cardiaque (Chen and Chan, 2009 ; Zhao et al., 2019). Cette transition est accompagnée d'une augmentation de la complexité du réseau mitochondrial, de la longueur et de la superficie des mitochondries. Ces changements progressifs reflètent la maturation des mitochondries à chaque étape du développement embryonnaire, soulignant l'importance de ce processus dans la différenciation des myocytes cardiaques et la fonction cardiaque globale (Hom et al., 2011). Selon la revue de Zhao et al. (2019), les mitochondries observées dans le cœur chez la souris avant E11.5 sont de classe 1 ou 2, représentant un stade immature. La structure de ces mitochondries immatures contient des crêtes tubulaires qui forment des connexions à la périphérie. La matrice de ces mitochondries est légèrement élargie et n'utiliserait que la glycolyse comme système de respiration. Durant les stades précoces du développement embryonnaire (E9 à E10.5), la maturation et l'activité des mitochondries sont essentielles pour le bon fonctionnement des cellules progénitrices cardiaques (Zolezzi et al., 2013 ; Tsushima et al., 2018).

La chaîne respiratoire, également connue sous le nom de chaîne de transport des électrons, est une série de complexes protéiques situés dans la membrane interne des mitochondries, où elle joue un rôle crucial dans la production d'énergie sous forme d'ATP (**Figure 38**). Ce processus commence au Complexe I (NADH déshydrogénase), qui reçoit des électrons du NADH, les transfère à l'ubiquinone (coenzyme Q10), et pompe des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, créant ainsi un gradient électrochimique. Le Complexe II (succinate déshydrogénase), bien qu'il ne pompe pas de protons, transfère des électrons du FADH2 à l'ubiquinone, tout en participant également au cycle de Krebs. Les électrons de l'ubiquinone réduite sont ensuite transmis au Complexe III (cytochrome bc1), qui les transfère au cytochrome c et pompe encore plus de protons à travers la membrane. Le Complexe IV (cytochrome c oxydase) prend les électrons du cytochrome c et les transfère à l'oxygène, le réduisant en eau tout en continuant de pomper des protons dans l'espace intermembranaire. Enfin, l'ATP synthase, bien que techniquement distincte de la chaîne de transport des électrons, utilise le gradient de protons créé par les complexes I, III, et IV pour phosphoryler l'ADP en ATP, complétant ainsi le processus de respiration cellulaire (Kampjut and Sazanov, 2020 ; Stephan and Ott 2020 ; Osyczka et al., 2005).

L'objectif principal de notre étude est d'étudier le profil métabolique/énergétique du cœur dans les cellules dérivées du SHF : l'OFT et les ventricules aux stades précoces du développement E9.0 et E10.5. Jusqu'à présent, le statut métabolique des cellules progénitrices du SHF et de ses dérivés dans l'OFT et le ventricule n'a jamais été étudié. Cependant, les résultats que nous avons obtenu concernant le rôle de *Pparγ* dans le développement cardiaque précoce (Rammah et al., 2022) ainsi que les données collectées pendant ma thèse avec les embryons issus de mères obèses soutiennent fortement le rôle crucial des changements métaboliques et certainement énergétique dans le développement cardiaque normal. Dans cet objectif, nous avons étudié de façon préliminaire les propriétés métaboliques du cœur au stade précoce du développement et dans les différentes régions qui retiennent notre intérêt. Nous pensons ainsi établir avec précision l'importance des évènements énergétiques dans le développement cardiaque précoce.

Résultats

Respiration Mitochondriale au stade E9.0 à E10.5

L'approche que nous avons utilisée permet d'étudier la fonction mitochondriale *in situ* pour tous les muscles dans une condition minimale de stimulation en étudiant la mise en place de la chaine respiratoire aux stades précoces du développement cardiaque. En effet, l'oxydation des substrats pyruvate (1 mM) et malate (2 mM) permet de tester l'utilisation des glucides.

Pour cette étude, nous avons collecté des embryons de souris à différents stades de développement (E9.0 à E10.5), puis isolé des régions spécifiques du cœur, telles que l'OFT et les ventricules, pour une analyse détaillée. Cette étude a été répétée 6 et 4 fois respectivement, montrant des résultats similaires à chaque réplica. Les tissus isolés ont été soumis à diverses conditions expérimentales pour évaluer leur activité respiratoire mitochondriale.

Nous avons utilisé plusieurs substrats pour activer différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure 38**) :

-Le pyruvate et le malate ont été utilisés pour stimuler le Complexe I.

-Le succinate a été utilisé pour activer le Complexe II.

-Le TMPD (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine) associé à l'ascorbate a servi à activer le Complexe IV.

En parallèle, nous avons employé des inhibiteurs spécifiques pour inhiber certaines fonctions mitochondriales :

-L'amytal a été utilisé pour inhiber le Complexe I.

-L'oligomycine a été utilisée pour bloquer le Complexe V, empêchant ainsi la formation d'ATP.

Figure 38

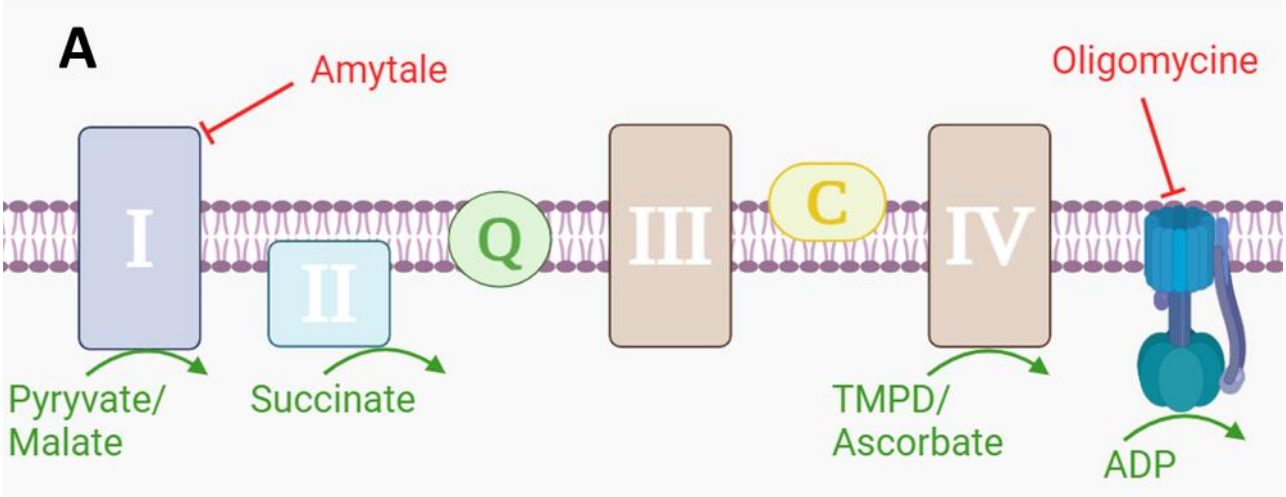


Figure 38

Utilisation des substrats sur l'activation et l'inhibition des complexes de l'ECT.

A. Schéma illustrant les substrats et inhibiteurs utilisés, ainsi que leurs sites d'action respectifs.

Figure 39

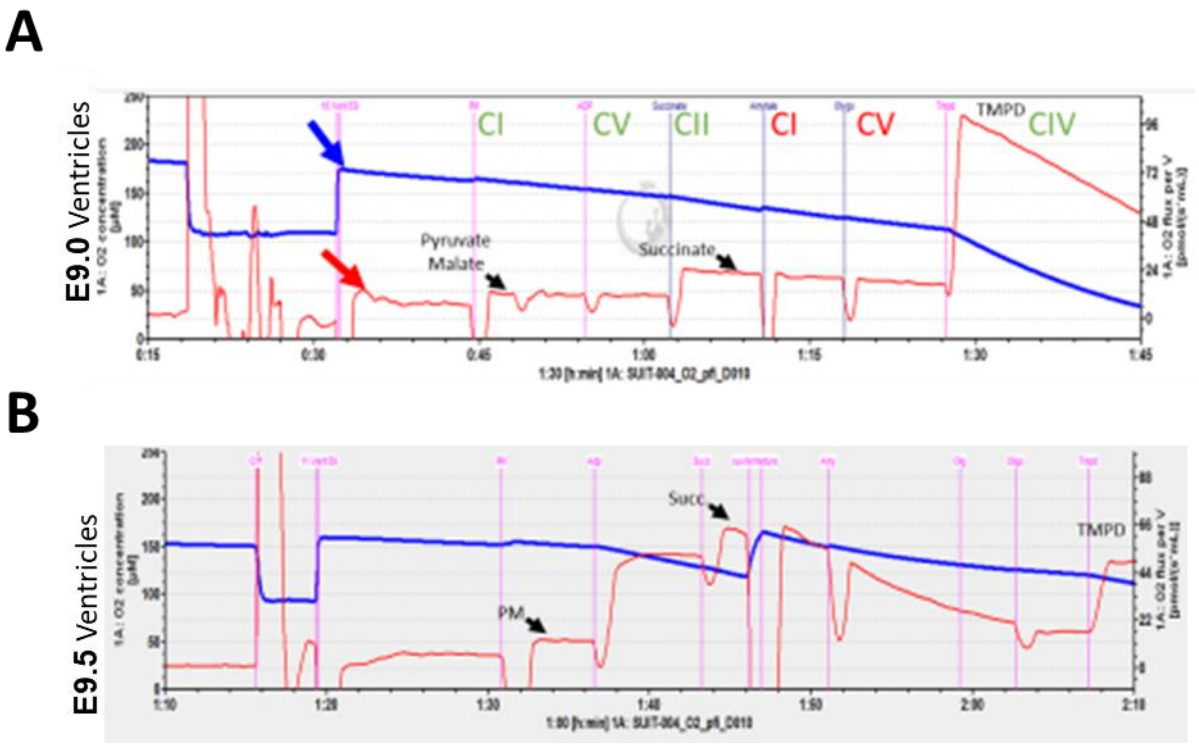


Figure 39

Détection des changements fonctionnels des mitochondries au stade E9.0 et E9.5 dans les ventricules.

A. Courbe représentant la respiration mitochondriale dans les ventricules au stade E9.0 (18 ventricules). **B.** Courbe représentant la respiration mitochondriale dans les ventricules au stade E9.5 (18 ventricules). La flèche bleue indique la concentration d'oxygène présente dans la cuve, tandis que la courbe rouge est le flux instantané d'oxygène en fonction de la nature du substrat.

Ces différents substrats nous ont permis de disséquer les contributions individuelles des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les régions cardiaques en développement. Les résultats qui ont été obtenus démontrent que l'OFT ne répond pas à l'activation des complexes de la respiration mitochondrial aux stades de développement précoces E9.0 et E9.5. En revanche, les ventricules montrent une mise en place précoce de la respiration mitochondriale. Ainsi, dans les ventricules dès le stade E9.0, une légère activation du complexe II est détectée suite à l'ajout de succinate, marquant le début de

l'activité respiratoire mitochondriale (**Figure 39A**). Cette activation devient plus prononcée à E9.5, avec des réponses marquées à travers toute la chaîne de respiration (**Figure 39B**). Au stade E10.5, la respiration mitochondriale est pleinement opérationnelle dans les ventricules et l'OFT (**Figure 40**). On observe des réponses significatives aux activateurs et inhibiteurs de chaque complexe de la chaine respiratoire (**Figure 40A-C**). A ce stade, une réponse aux différents complexes de la chaîne de transport d'électrons est observée dans l'OFT indiquant que la fonction respiratoire des mitochondries se met en place dans cette région du cœur (**Figure 40B-C**). La méthode de calcul de la consommation d'oxygène par unité de temps a été établie en fonction de la quantité de tissu placée dans la cuve de mesure. Nous avons d'abord compté le nombre moyen de cellules présentes dans un OFT et dans un ventricule, obtenant une moyenne de 298 cellules par OFT et de 755 cellules par ventricule. Pour chaque expérience, nous avons ensuite ajusté ce nombre en fonction du nombre d'OFT ou de ventricules mis en cuve, en utilisant le calcul suivant: 298×nombre d'OFT en cuve ou 755×nombre de ventricules en cuve. Nous avons ensuite utilisé les données de consommation d'oxygène (O_2 flux per V, exprimée en pmol/(s*mL)) obtenues avec l'instrument Oroboros. À chacune de ces valeurs, nous avons soustrait le bruit de fond lié à la vitesse de l'électrode pour obtenir une valeur de référence. Cette valeur de référence a ensuite été multipliée par 0,6 qui correspond au volume de la cuve (en mL), puis par 1000 pour convertir les picomoles (pmol) en femtomoles (fmol).

Figure 40

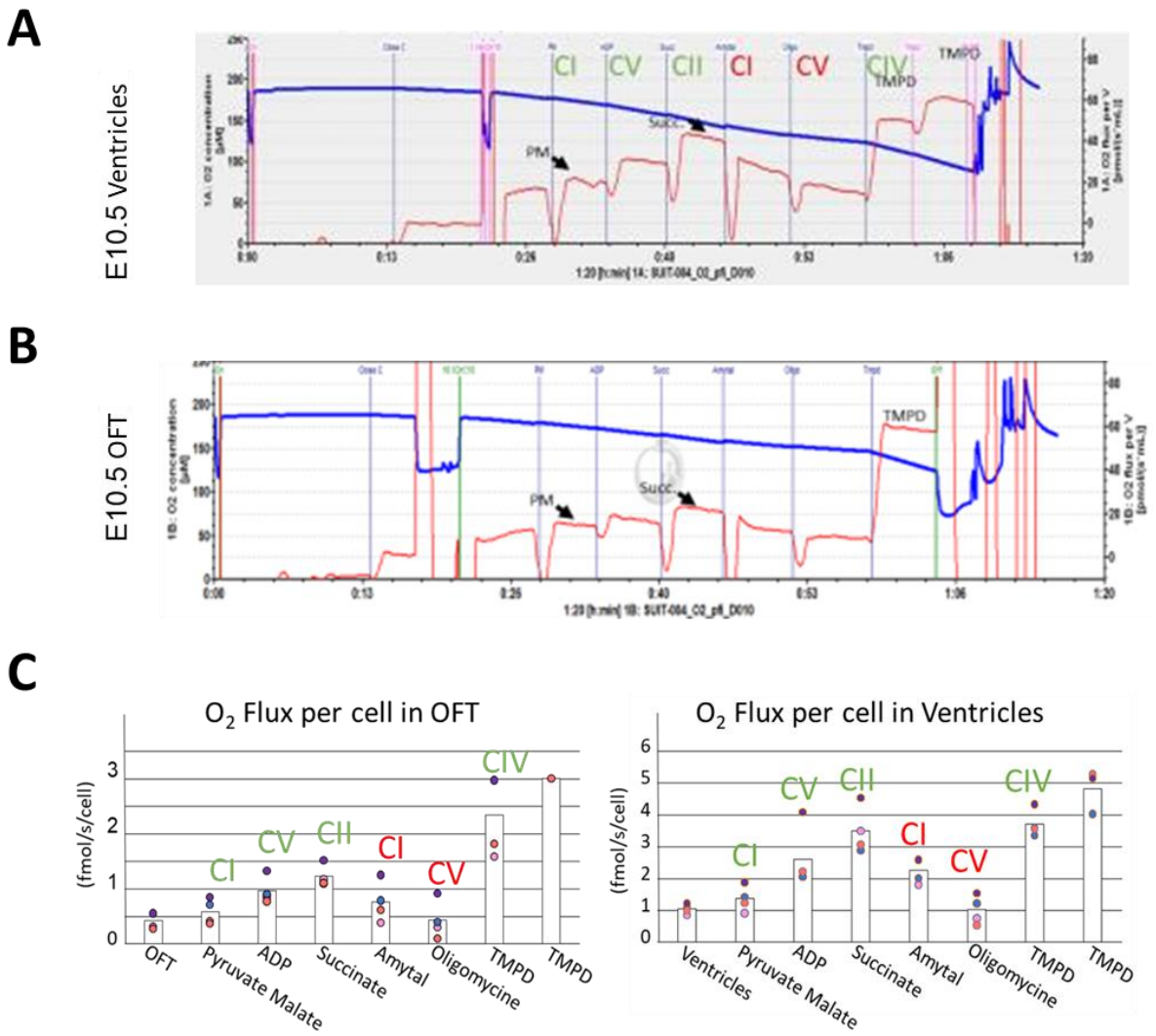


Figure 40

Détection des changements fonctionnels des mitochondries à E10.5 dans les ventricules et l'OFT.

A. Courbe représentant la respiration mitochondriale dans les ventricules à E10.5 (3 ventricules). La flèche bleue indique la concentration d'oxygène présente dans la cuve, tandis que la courbe rouge est le flux instantané d'oxygène en fonction de la nature du substrat. B. Courbe représentant la respiration mitochondriale dans les OFT à E10.5 (18 OFT). La flèche bleue indique la concentration d'oxygène présente dans la cuve, tandis que la courbe rouge est le flux instantané d'oxygène en fonction de la nature du substrat. **C.**

Histogramme récapitulatif des différentes études (n=3-5) de la respiration mitochondriale dans les tissus étudiés au stade E10.5.

Enfin, nous avons divisé cette valeur par le nombre de cellules correspondant au tissu dans la cuve, afin d'obtenir la consommation d'oxygène normalisée par cellule. Ces observations démontrent que, dans des conditions ND, la chaîne de respiration mitochondriale est active dès les stades précoces du développement embryonnaire, ce qui témoigne de la maturation précoce et de l'efficacité des mitochondries dans le cœur embryonnaire.

Conclusion

En conclusion, notre étude a révélé que les tissus cardiaques, en particulier les OFT et les ventricules, présentent des réponses distinctes à l'activation des complexes de la chaîne de transport d'électrons à différents stades de développement. Les OFT ne montrent pas de réponse mesurable à l'activation des complexes de la respiration aux stades précoces (E9.5), mais commencent à réagir à partir de E10.5. En revanche, les ventricules montrent une mise en place de la respiration mitochondriale dès E9.0, avec une faible activation du complexe II, confirmée par des réponses plus significatives à E9.5 et une respiration complète observée à E10.5. Cela vient contredire l'étude faite par Zhao et al., 2019 qui indiquait l'immaturité mitochondriale en amont du stade E 11.5. Dans notre étude, l'oxymètre OROBOROS nous permet de détecter de faible changement de consommation d'oxygène dans une cuve de petit volume avec des tissus perméabilisés. L'OROBOROS permet de mesurer la respiration à des niveaux d'oxygène contrôlés sur de petites quantités d'échantillons biologiques. Les échantillons peuvent être utilisées pour l'analyse bioénergétique et OXPHOS. L'OXPHOS est le processus cellulaire principal de production d'ATP dans les mitochondries qui utilise l'énergie libérée par le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire pour pomper des protons à travers la membrane interne mitochondriale. Cette différence de concentration de protons entraîne la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. L'oxygène est l'accepteur final des électrons, permettant la formation d'eau. Ce processus est essentiel pour la production d'énergie dans les cellules à haute demande énergétique (Houštěk et al., 2014). Les données expérimentales sont affichées non seulement sous forme de

concentration d'oxygène dans le temps, mais aussi sous forme de transformation en temps réel de ces données permettent à l'expérimentateur de suivre la respiration.

Les résultats qui ont été obtenus démontrent que, dans des conditions de régime normal, la chaîne de respiration mitochondriale est active dès les stades précoces du développement, attestant de la maturation précoce des mitochondries dans le cœur. Cette maturation mitochondriale est certainement cruciale pour le bon développement cardiaque. Les différences observées entre les OFT et les ventricules mettent en évidence des dynamiques de développement distinctes au sein des différents compartiments cardiaques, contribuant ainsi à la complexité du développement cardiaque. La régionalisation transcriptionnelle de l'OFT pourrait jouer un rôle clé dans ces différences de maturation. Une analyse approfondie des profils d'expression des gènes par RTqPCR ou scRNAseq dans les différentes régions de l'OFT pourrait révéler des disparités importantes entre ces zones, suggérant que des mécanismes régulateurs spécifiques pourraient influencer la maturation et la fonction mitochondriale dans ces régions distinctes.

Nous avions vu précédemment que PPARγ, joue un rôle essentiel dans la protection mitochondriale et la biogenèse (Wang et al., 2010). Les récepteurs liés aux œstrogènes quant à eux, régulent une partie des cibles de PPAR qui sont impliquées dans plusieurs voies de production d'énergie, telles que le transport et l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie et le péroxysome, ainsi que la respiration mitochondriale et le nom des gènes. La juxtaposition de mitochondries et de gouttelettes lipidiques a été décrite dans les tissus adipeux et musculaires squelettiques. Il semble donc que l'interaction avec les gouttelettes lipidiques ait un effet inhibiteur sur la dynamique mitochondriale (Wang et al., 2011 ; Benador et al., 2018 ; Giacomello et al., 2020). L'effet inhibiteur de cette interaction pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes. D'une part, l'accumulation de lipides autour des mitochondries pourrait physiquement restreindre leur capacité à se déplacer ou à fusionner avec d'autres mitochondries, perturbant ainsi leur réseau fonctionnel (Itoh et al., 2012 ; Zolezzi et al., 2013). D'autre part, les lipides pourraient induire des modifications biochimiques ou un stress oxydatif qui affectent directement la fonction mitochondriale. Par exemple, des niveaux élevés de lipides peuvent mener à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène, qui endommagent les composants

mitochondriaux et altèrent leur performance. Nous avions vu que les niveaux de ROS restent élevés dans les cardiomyocytes de souris à l'embryon E9.5 et diminuent avec le développement embryonnaire (Hom et al., 2011). Outre leur rôle dans la régulation de la différenciation et de la maturation des cardiomyocytes, les ROS peuvent également influencer leur prolifération. Pris ensemble, les ROS jouent un rôle complexe au cours de la cardiogenèse, et leurs effets dépendent du stade de développement. Ils peuvent endommager les lipides, les protéines et l'ADN mitochondrial, compromettant la fonction mitochondriale et entraînant des dysfonctionnements cellulaires (Zorov et al., 2014). De plus, cette interaction pourrait également influencer la régulation du métabolisme énergétique global de la cellule. Les mitochondries en contact avec les gouttelettes lipidiques pourraient subir une réduction de leur capacité à oxyder les acides gras, menant à une accumulation lipidique supplémentaire et exacerbant les dysfonctionnements métaboliques (Garcia-Fuentes et al., 2010).

Dans des conditions de régime riche en graisses (HFD), cette dynamique de fonction mitochondriale au cours du développement pourrait être altérée. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'obésité maternelle affecte le développement cardiaque, on peut donc envisager que dans ces conditions la fonction mitochondriale soit perturbée. Nous avons déjà observé par qRT-PCR (**Figure 32**), une dérégulation des facteurs de transcription liés à la synthèse des lipides, tels que *Pparγ*, *Plin4* et *Plin5* ainsi qu'un défaut d'élongation de l'OFT. L'environnement riche en graisses affecte donc le profil transcriptomique et le développement de l'OFT. Cette perturbation est probablement due à une augmentation du stockage des lipides dans le cœur embryonnaire, entraînant des anomalies dans le développement cardiaque (**Figure 32C-E**). Par conséquent, il est essentiel de mener des études plus approfondies pour examiner comment un régime HFD influence la maturation mitochondriale et la respiration cardiaque à différents stades de développement. Une étude de la respiration mitochondriale sur des tissus cardiaques provenant de mères obèses paraît nécessaire. On peut proposer que les perturbations observées dans l'absorption des lipides, notamment dues à un environnement riche en graisses, sont capables d'altérer le cycle respiratoire mitochondrial. Ces altérations sont provoquées par la dérégulation de facteurs de transcription clés, tels que *Pparγ*, qui jouent un rôle crucial dans la régulation lipidique et énergétique des cellules cardiaques. De plus, l'inhibition de la dynamique mitochondriale associée à ces perturbations peut avoir des

conséquences significatives sur le développement cardiaque normal (Giacomello et al., 2020). Cette étude permettrait de mettre en lumière les mécanismes sous-jacents à ces dysfonctionnements. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait offrir des perspectives pour prévenir et traiter les anomalies cardiaques associées à l'obésité maternelle.

Discussion générale et perspectives

La relation entre l'obésité maternelle et le développement embryonnaire est un domaine de recherche crucial en raison de ses implications sur la santé cardiaque des nouveau-nés. Des études antérieures ont montré que l'exposition à un environnement riche en graisses pendant la gestation augmente le risque de malformations cardiaques et d'obstruction des voies d'éjection chez les embryons (Persson et al., 2017 ; Turunen et al., 2024). Dans ce contexte, notre étude visait à comprendre les mécanismes par lesquels un régime maternel riche en graisses influence le développement cardiaque embryonnaire.

Impact de l'obésité maternelle sur les malformations cardiaques

Nos recherches ont été réalisées avec des souris Swiss CD1. Nous avons étudié des embryons issus de croisement de femelles obèses par un régime gras avec des mâles soumis à un régime normal. Ainsi, nous avons pu observer que 79 % des embryons obtenus des mères obèses développent des malformations cardiaques, principalement des hypertrophies des ventricules (préférentiellement le ventricule gauche), des défauts de compaction ventriculaire et des défauts de septation ventriculaire. Ainsi, ces premières observations démontrent que l'obésité maternelle chez la souris permettait de reproduire des évènements pathologiques observés chez l'Homme (Persson et al., 2017 ; Turunen et al., 2024). Toutefois, notre étude démontre également l'existence d'une mortalité embryonnaire notable et accrue entre les stades embryonnaires E9.5 et E12.5. Cette mortalité précoce s'accompagne d'un dérèglement de la région conotroncale en condition HFD. Les résultats obtenus en RT-qPCR sur la région de l'OFT qui permet le développement du pôle artériel du cœur permettent d'attribuer le défaut de développement de cette région du cœur embryonnaire à une absorption excessive de lipide. La balance transcriptionnelle, notamment pour les gènes régulateurs des lipides tels que *Pparγ*, *Plin4* et *Plin5*, qui jouent des rôles dans le métabolisme lipidique, est modifiée et l'ajout des cellules progénitrices cardiaques du SHF est perturbé. Ainsi, l'absorption excessive de lipides dans la région conotroncale perturbe non seulement la régionalisation et la différenciation des cellules progénitrices cardiaques mais également l'équilibre transcriptionnel crucial pour un développement cardiaque normal. Il serait pertinent à présent de poursuivre des recherches pour mieux comprendre les mécanismes d'absorption des lipides dans le cœur embryonnaire et en particulier dans la région de l'OFT. Cela pourrait inclure des études ciblées sur les transporteurs lipidiques

et les voies de signalisation impliquées dans la capture et l'utilisation des lipides par les cellules cardiaques. Une compréhension approfondie de ces mécanismes permettrait d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour prévenir ou atténuer les effets néfastes de l'obésité maternelle sur le développement cardiaque embryonnaire. Par exemple, la modulation des voies de signalisation impliquées dans l'absorption et le métabolisme des lipides, ainsi que l'utilisation de médicaments ou de nutriments spécifiques pour équilibrer la concentration lipidique dans le cœur embryonnaire, pourraient être explorées. Des interventions nutritionnelles visant à optimiser l'alimentation maternelle avant et pendant la grossesse pourraient également avoir un impact significatif sur la réduction des risques de malformations cardiaques chez les nouveau-nés.

Régionalisation et absorption des lipides dans l'OFT

Notre étude a révélé des anomalies spécifiques dans la longueur de l'OFT chez les embryons provenant de mères soumises à un régime riche en graisses à E10.5. Les résultats obtenus suggèrent un défaut dans l'ajout de cellules progénitrices cardiaques du SHF. Les colorations Oil red O ont montré une accumulation de gouttelettes lipidiques dans l'OFT et le SHF chez les embryons qui semble localisé. Cette observation est cohérente avec des études antérieures sur la régionalisation des gènes, tels que *Pparγ, Hes1* et *TBX1*, qui jouent des rôles critiques dans le développement différencié des cellules progénitrices de l'OFT (Théveniau-Ruissy et al., 2008 ; Rana et al., 2014 ; Rochais et al., 2009). Ces études montrent qu'une dérégulation de l'un de ces gènes peut entraîner des malformations cardiaques, en particulier dans la région conotroncale. Dans notre cas, nous avons observé une réduction de la taille de l'OFT, probablement due à un apport insuffisant de cellules progénitrices, qui semble être perturbé par une présence anormalement élevée de lipides dans cette région. Il serait intéressant d'examiner si les phénotypes observés chez les mutants *Hes1* ou *Tbx1* subissent des modifications lorsqu' ils sont soumis à un régime riche en graisses. Cette investigation pourrait révéler si le régime alimentaire et la présence accrue de gouttelettes lipidiques influencent l'expression des gènes *Hes1* ou *Tbx1*. Il serait aussi pertinent d'approfondir l'étude de

cette accumulation régionale de gouttelettes lipidiques à l'aide de la coloration Oil Red O, afin de déterminer si leur présence est significativement plus importante dans la partie inférieure de l'OFT chez les embryons issus de mères soumises à un régime riche en graisses par rapport à ceux nourris avec un régime normal. Les études préliminaires semblent indiquer une telle tendance, mais il sera nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons pour confirmer ces résultats. Une telle étude pourrait confirmer que, dans les embryons ND, les gouttelettes lipidiques se trouvent principalement dans la partie supérieure de l'OFT, tandis qu'en condition HFD, elles se localisent majoritairement dans l'iOFT. Cette répartition atypique des lipides serait en accord avec les dérèglements de la balance transcriptionnelle et l'augmentation des défauts cardiaques. Pour approfondir ces observations, une analyse par single cell RNA-seq au stade E10.5 sur des embryons ND et HFD permettrait d'identifier quelles voies de signalisation ou quels facteurs de transcription sont altérés dans un environnement riche en graisses. Cette méthode offrirait une vue détaillée des profils d'expression génique au niveau cellulaire, révélant potentiellement des régulations différentielles critiques entre les embryons ND et HFD.

Les résultats de nos analyses RT-qPCR indiquent une dérégulation des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides sous conditions HFD, en particulier *Pparγ*. Ainsi, l'environnement HFD conduit à une surexpression de *Pparγ*, perturbant la migration des cellules progénitrices ou induisant leur mort cellulaire, ce qui entraîne un raccourcissement de l'OFT et des malformations cardiaques structurelles spécifiques. Ce résultat suggère un rôle crucial de PPARγ dans le processus d'allongement du tube cardiaque à partir des progéniteurs du SHF, cohérent avec l'expression de *Pparγ* dans l'OFT distal et la zone de transition. En effet, l'inhibition de l'activité de *PPARγ* conduit à un OFT significativement plus court que celui des embryons normaux et *Pparγ* est capable d'activer ou d'inhiber certains gènes dans les parties inférieure et supérieure de l'OFT (Rammah et al., 2022). Bien que notre étude confirme l'impact de *Pparγ*, il reste à déterminer si ce gène est le seul à causer le défaut d'ajout de cellules progénitrices ou si sa dérégulation sous condition HFD affecte toute la voie de signalisation de *PPARγ*.

Variabilité génétique et mortalité embryonnaire

En utilisant un modèle de souris mutant *Mesp1-cre;Pparγ ^{fl}/^{fl}*, nous avons observé des variations significatives dans les proportions des génotypes et des anomalies cardiaques, influencées par l'obésité maternelle. Nos résultats montrent que l'obésité maternelle, induite par un régime HFD, augmente le poids corporel des souris et impacte directement le développement cardiaque des embryons. De manière intéressante, la suppression du gène *Pparγ* dans les progéniteurs cardiaques précoces semble atténuer certains défauts cardiaques, réduisant ainsi la fréquence des malformations chez les embryons mutants. Il serait crucial de mener une analyse par RT-qPCR pour identifier les facteurs de transcription impactés chez les embryons mutants sous conditions HFD et ND. Cela permettra de déterminer les régulations géniques spécifiques induites par la suppression de *Pparγ* dans les progéniteurs cardiaques, et de comprendre comment ces régulations contribuent à la réduction des malformations cardiaques. Une étude approfondie pour étudier l'absorption des lipides et de la longueur de l'OFT chez les embryons mutants entre les stades E9.5 et E11.5 en condition HFD est nécessaire. Cela aiderait à comprendre si la suppression de *Pparγ* dans les progéniteurs cardiaques ralentit l'absorption des lipides environnants ou si un autre mécanisme d'action est en jeu. La coloration Oil Red O et la microscopie électronique permettraient de répondre à nos attentes. Parallèlement, l'analyse de l'expression des gènes liés au métabolisme lipidique, tels que *CD36, FABP4*, et les gènes de la β-oxydation, pourrait fournir des indices sur les mécanismes sous-jacents à l'accumulation lipidique. Il serait également intéressant d'examiner les niveaux de stress oxydatif et l'intégrité mitochondriale dans ces cellules, car des études antérieures ont montré que Pparγ régule ces aspects du métabolisme cellulaire (Wang et al., 2011; Benador et al., 2018). Cette investigation pourrait inclure des techniques d'imagerie comme de l'immunofluorescence afin d'étudier la mort cellulaire et la prolifération dans la région de l'OFT et du SHF, ou bien pour visualiser l'accumulation lipidique et des mesures morphologiques détaillées de l'OFT avec des marquage Bodipy et Oil Red O. Pour approfondir ces observations, une analyse par single cell RNA-seq au stade E10.5 sur des embryons ND et HFD permettrait d'identifier quelles voies de signalisation ou quels facteurs de transcription sont altérés dans un environnement riche en graisses. Ces résultats pourraient être comparés à ceux des embryons CD1 pour mieux comprendre les différents mécanismes d'action impliqués dans le cas d'embryons mutants. Des molécule pharmacologiques antagonistes de *Pparγ*, comme le GW9662, sur des embryons en culture pourraient fournir des informations supplémentaires sur les stades spécifiques

où l'inactivation de *Pparγ* pourrait être bénéfique pour éviter les défauts cardiaques. Des études antérieures ont montré que les embryons traités avec GW9662 pendant 24 heures à E8.5 présentaient une morphogenèse altérée de l'OFT (Rammah et al., 2022). Ces observations suggèrent qu'une modulation précise de l'activité de *Pparγ* est cruciale pour le développement normal du cœur.

Nos observations indiquent que les proportions des génotypes des embryons mutants ne suivent pas strictement les lois mendéliennes, ce qui pourrait être dû à des mécanismes de sélection embryonnaire influencés par l'environnement HFD. Il serait intéressant de conduire des études supplémentaires pour explorer ces mécanismes, en examinant des paramètres tels que la viabilité embryonnaire en augmentant le nombre d'individu étudié, les taux de division cellulaire, et la survie cellulaire en conditions HFD. Une étude systématique des taux de survie et des anomalies morphologiques des embryons de différents génotypes dans des conditions HFD et ND permettrait de mieux comprendre les processus de sélection embryonnaire. Des techniques de marquage cellulaire et d'analyse des lignages pourraient être utilisées pour tracer la dynamique des cellules progénitrices et leur contribution au développement cardiaque.

Maturation mitochondriale et implications fonctionnelles

Notre étude a également démontré que la chaîne de respiration mitochondriale est active dès les stades précoces du développement cardiaque dans des conditions de régime normal. Cependant, sous un régime HFD, ces dynamiques de développement mitochondrial n'ont pas encore été étudiées. En condition HFD, nous avons observé une dérégulation des facteurs de transcription liés à la synthèse des lipides, tels que *Pparγ*, *Plin4* et *Plin5*. Nous savons que l'expression de la périlipine, une protéine associée aux gouttelettes lipidiques des adipocytes qui régule le stockage des lipides et l'accumulation de graisse corporelle, est régulée par *Pparγ* (Bogacka et al., 2007). Ces altérations perturbent la maturation mitochondriale et la respiration cardiaque, conduisant à des malformations cardiaques et à une mortalité embryonnaire et postnatale accrue.

Il a été démontré que l'activation mitochondriale soutient la prolifération et la différenciation des cellules souches en fournissant de l'énergie et des métabolites agissant comme molécules de signalisation (Luo et al., 2019 ; Guo et al., 2020). Un stress

mitochondrial concomitant peut entraîner une perte de l'auto-renouvellement des cellules souches et nécessite la surveillance de divers mécanismes de contrôle de la qualité mitochondriale. Le stress oxydatif mitochondrial pourrait être évalué en utilisant des sondes fluorescentes spécifiques, comme le MitoSOX Red, qui permet de détecter et quantifier les espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la cytométrie en flux ou la microscopie à fluorescence. Ensuite, la fonction mitochondriale globale peut être mesurée à l'aide d'un analyseur de flux extracellulaire (comme le Seahorse XF Analyzer) pour déterminer l'efficacité de la respiration mitochondriale, en observant la consommation d'oxygène et la production d'acide lactique. Des études ont montré que dans un contexte métaboliquement altéré, comme dans certaine maladie, l'activation de *Pparγ* semble bénéficier des paramètres métaboliques, tandis que chez les individus en bonne santé, sa régulation négative présente des effets anti-obésité (Garcia-Fuentes et al., 2010). Cette dualité se manifeste également dans l'expression de *Pparγ*, où les réponses métaboliques varient entre les individus en bonne santé et ceux atteints de maladies métaboliques. Par exemple, un régime riche en graisses entraîne une augmentation de l'expression de *Pparγ* chez les sujets sains, mais une diminution chez les personnes souffrant d'obésité morbide (Garcia-Fuentes et al., 2010). De plus, il a été démontré que la forme tronquée de *Pparγ2* est principalement localisée dans la matrice mitochondriale et régule la transcription de l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial, situé dans la matrice mitochondriale, code 11 sous-unités clés des complexes I, III et IV de la chaîne de transport d'électrons et 2 sous-unités de l'ATP synthase (Chang et al., 2018).

Des données de spectrophotométrie suggèrent que *Pparγ2* mitochondrial affecte la respiration mitochondriale en influençant l'expression des gènes de la chaîne de transport d'électrons codés par l'ADN mitochondrial dans les adipocytes bruns. De nombreuses sous-unités de la chaîne de transport d'électrons codées par l'ADN nucléaire s'assemblent en sous-complexes dans la matrice mitochondriale, et leur redistribution à la membrane mitochondriale interne est accélérée par les sous-unités codées par l'ADN mitochondrial (Bourges et al., 2004). Ces données indiquent donc un lien certain entre *Pparγ* et la fonction mitochondriale.

Les mitochondries sont la principale source de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules. À des niveaux modérés, les ROS fonctionnent comme des molécules de signalisation essentielles, régulant divers processus cellulaires tels que

la prolifération, l'apoptose, et la réponse au stress. Le peroxyde d'hydrogène (H2O2) peut modifier l'activité des protéines en oxydant des résidus cystéines, influençant ainsi des voies de signalisation importantes. De plus, lorsque la production de ROS dépasse la capacité des systèmes antioxydants à les neutraliser, cela conduit à un stress oxydatif qui peut endommager les lipides, les protéines et l'ADN mitochondrial (Zorov et al., 2014), compromettant la fonction mitochondriale et entraînant des dysfonctionnements cellulaires. Il semble que l'interaction avec les gouttelettes lipidiques ait un effet inhibiteur sur la dynamique mitochondriale, peut-être en influençant directement la machinerie de fusion-fission, ou en exposant ses acteurs principaux à un flux constant d'acides gras ou de leurs dérivés qui pourraient les inhiber.

Ainsi, des niveaux élevés de ROS dans les cardiomyocytes embryonnaires, comme observé chez des souris à E9.5, pourraient favoriser la différenciation des cardiomyocytes à partir des cellules précurseurs (Hom et al., 2011). A des stades ultérieurs, une réduction des niveaux de ROS, par la fermeture des pores de transition de perméabilité mitochondriale, est nécessaire pour la maturation normale des cardiomyocytes. Des niveaux excessifs de ROS, résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial dans les cœurs embryonnaires, peuvent donc entraîner des cardiomyopathies congénitales sévères. Cela se produit par l'activation des voies de dommages à l'ADN, inhibant ainsi la prolifération des cardiomyocytes. Il est donc crucial de réaliser des études sur des embryons ND et à des régimes riches en graisses pour déterminer si les réponses au ROS varient en fonction de l'environnement de développement et des différents stades embryonnaires. Cela pourrait offrir de nouvelles perspectives pour identifier le rôle des ROS dans le développement cardiaque et les malformations associées.

Les résultats obtenus en OROBOROS devront être complétés avec des expérience de respiration mitochondriale en Seahorse. Le Seahorse est un appareil de mesurer une respiration mitochondriale plus faible mais requiert de travailler sur des cellules en cultures. Cela permettrait de confirmer les résultats initiaux et de détecter des variations subtiles dans la fonction mitochondriale. Associer cette étude, de l'imagerie par microscope électronique de la région de l'OFT et du SHF pour observer la morphologie des mitochondries à des stades précoces, de E9.0 à E10.5, permettrait de vérifier la maturation des crêtes mitochondriales. Ces observations pourraient fournir des preuves

visuelles des altérations mitochondriales sous régime HFD. L'étude de la respiration mitochondriale chez les embryons soumis à un régime HFD semble indispensable pour établir le lien entre les résultats obtenus et les hypothèses liées au dérèglement mitochondrial en milieu riche en graisses, ainsi que son impact potentiel sur le développement cardiaque. Cette analyse pourrait inclure des techniques de mesure de la consommation d'oxygène et de la production d'ATP pour évaluer la fonctionnalité mitochondriale globale. Pour finir l'utilisation de MitoTracker sur les embryons permettrait de quantifier et de localiser précisément les mitochondries dans la région conotroncale. Le MitoTracker est un type de colorant fluorescent couramment utilisé en biologie cellulaire pour marquer et visualiser les mitochondries activent dans les tissus. La présence et la quantité de mitochondries pourrait être établies, fournissant des données cruciales pour comprendre comment les altérations mitochondriales influencent le développement cardiaque en condition HFD.

Conclusion Générale

Les résultats de cette étude explorent l'impact de l'obésité maternelle induite par un régime HFD sur le développement cardiaque embryonnaire en utilisant un modèle de souris. Nos résultats montrent que l'exposition à un environnement HFD pendant la gestation entraîne des malformations cardiaques significatives, des perturbations transcriptionnelles et une mortalité embryonnaire précoce.

Premièrement, nos données montrent que les embryons issus de mères obèses ont une probabilité plus élevée de développer des malformations cardiaques, avec 79 % des embryons présentant des anomalies. Cette corrélation est appuyée par la littérature, qui indique que les environnements riches en graisses augmentent le risque de malformations complexes et d'obstructions des voies d'éjection (Turunen et al., 2024). En particulier, la région conotroncale du cœur est fréquemment affectée, ce qui est essentiel pour la morphogenèse cardiaque. La suppression du gène *Pparγ* dans les progéniteurs cardiaques précoces a montré une réduction des malformations cardiaques chez les embryons mutants, suggérant un rôle protecteur de ce gène contre les effets néfastes de l'obésité maternelle.

Deuxièmement, notre analyse a révélé que 12 % des embryons collectés entre les stades E9,5 et E12,5 sont morts in utero, avec une majorité des décès survenant au stade E10,5. Ces résultats suggèrent que l'exposition à un environnement HFD perturbe des périodes critiques du développement embryonnaire, ce qui entraîne une mortalité accrue. Une fois encore, les mutants *Pparγ* semblent présenter moins de mortalité en condition HFD que ND, appuyant ainsi son effet de protection. Pour comprendre les mécanismes sous-jacents à ces morts précoces, nous avons analysé les différentes longueurs de l'OFT chez les embryons issus de mères HFD et ND. Les différences de longueurs significatives entre les embryons HFD suggèrent des défauts dans l'ajout de cellules progénitrices cardiaques. La coloration Oil Red O a montré une accumulation de gouttelettes lipidiques dans la région OFT, particulièrement enrichie dans la partie inférieure chez les embryons HFD. Ces résultats indiquent une absorption des lipides environnants dans la région conotroncale, ce qui pourrait altérer la fonction mitochondriale dans les cellules progénitrices cardiaques dans un environnement HFD. Ces anomalies peuvent être attribuées à une dérégulation des voies transcriptionnelles essentielles à la régionalisation et à la différenciation des cellules dans cette région.

De plus, l'étude a révélé que les souris issues de mères obèses présentaient des défauts cardiaques dès le stade embryonnaire E15.5, notamment des anomalies de compaction et des hypertrophies ventriculaire. Par ailleurs, une accumulation lipidique intraventriculaire a été observée après la naissance, entraînant des complications cardiaques graves qui conduisent souvent à la mort des souriceaux. En condition HFD la dérégulation des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, notamment *Pparγ*, a été confirmée par des analyses RT-qPCR. Nos résultats suggèrent que l'environnement HFD provoque une surexpression du gène *Pparγ* et de ses analogues, perturbant ainsi la migration des cellules progénitrices ou induisant la mort cellulaire, conduisant à un raccourcissement de l'OFT.

Nos observations montrent que les tissus cardiaques, en particulier les OFT et les ventricules, présentent des réponses distinctes à l'activation des complexes de la chaîne de transport d'électrons à différents stades de développement embryonnaire. Contrairement aux études précédentes (Zhao et al., 2019), nos résultats indiquent que la chaîne de respiration mitochondriale est active dès les stades précoces du développement, attestant de la maturation précoce des mitochondries dans le cœur. Cette observation concorderait avec notre hypothèse selon laquelle un environnement HFD pourrait altérer la fonction mitochondriale dans les cellules progénitrices cardiaques. Cette altération, couplée à la perturbation de certains facteurs de transcription, pourrait provoquer des défauts lors du développement cardiaque. Cette maturation mitochondriale précoce est donc cruciale pour le bon développement cardiaque et souligne l'importance d'un environnement nutritionnel adéquat pendant la gestation.

En conclusion, notre étude réalisée chez la souris démontre que l'obésité maternelle induite par un régime HFD entraîne des malformations cardiaques congénitales chez l'embryon, avec des pathologies cardiaques sévères pouvant entraîner une mort prématurée ou des complications postnatales. Comme cela a été observé chez des cohortes d'enfants issus de mères en surpoids, les enfants nés de mères obèses présentent des malformations congénitales, en particulier dans la région conotroncale du cœur (Stothard et al., 2009 ; Gilboa et al., 2010 ; Persson et al., 2017 ; Persson et al., 2019 ; Turunen et al., 2024). Les études qui ont été réalisées ici suggèrent que d'autres études

plus poussées doivent être réalisées afin de définir de façon détaillée les mécanismes sous-jacents à ces pathologies. Les altérations métaboliques induites par un régime riche en graisses chez la mère affectent directement le développement embryonnaire à des stades précoces critiques (**Figure 41**). Les résultats obtenus soulignent l'importance de la nutrition maternelle et de la prise en charge de l'obésité pour prévenir les maladies cardiaques congénitales et assurer une santé optimale à leurs enfants. Du point de vue de la recherche fondamentale, des études plus approfondies des mécanismes impliqués dans ces altérations seront essentielles pour développer des stratégies de prévention et de traitement efficaces dont notamment l'étude de la fonction de *Pparγ*.

Figure 41

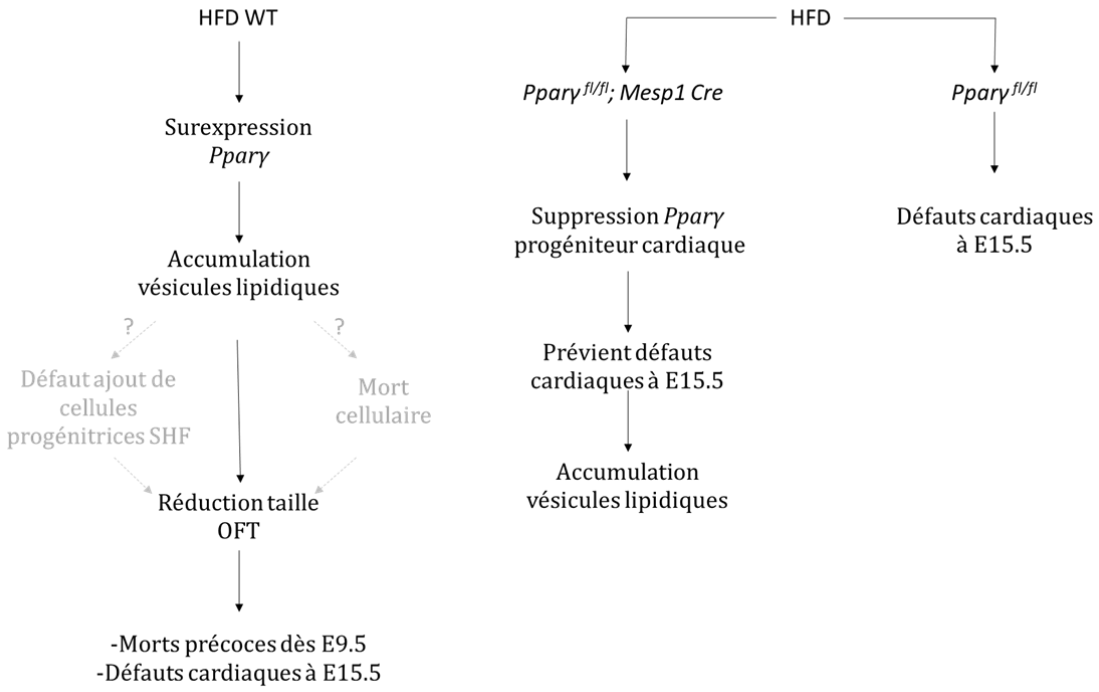


Figure 41

Figure récapitulative.

Ce schéma récapitule les résultats obtenus par différentes approches chez les embryons provenant de mères HFD sur nos souris CD1 et les mutants de *Pparγ*.

Liste des figures

FIGURE 1 : STRUCTURE DU CŒUR ADULTE ET TRAJET SANGUIN. 20
FIGURE 2 : FONCTIONNEMENT DE LA CONTRACTION CARDIAQUE. 22
FIGURE 3 : DEVELOPPEMENT DU CŒUR CHEZ LES MAMMIFERES 24
FIGURE 4 : REGIONALISATION DU CŒUR 29
FIGURE 5 : LES DIFFERENTES CARDIOPATHIES CONGENITALES 33
FIGURE 6 : MIGRATION DES CRETES NEURALE CARDIAQUE 37
FIGURE 7 : REGULATION DES CELLULES PROGENITRICES CARDIAQUES DANS LES CHAMPS CARDIAQUES ANTERIEUR ET POSTERIEUR 39
FIGURE 8 : EXPRESSION DU TRANSGENE *SEMA3C-LACZ* DANS LES CŒURS MUTANTS *TBX1*. 41
FIGURE 9 : SITES D'EXPRESSION DU TRANSGENE *MLC1V-NLACZ-24* (*FGF10* ENHANCER TRAP) A DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT. 43
FIGURE 10 : VOIES CLASSIQUES FGF/FGFR. 45
FIGURE 11 : GATA4 EST NECESSAIRE AU DEVELOPPEMENT DE L'OFT DANS LES CELLULES RECEPTRICES DE HH 47
FIGURE 12 : REDUCTION DE MYOCARDE SOUS-PULMONAIRE CHEZ LES MUTANTS *WNT5A*$^{-/-}$ 49
FIGURE 13 : LA REDUCTION OU L'EXCES DE SIGNALISATION AR ENTRAINE DES ANOMALIES DANS LA CONTRIBUTION DES PROGENITEURS CARDIAQUES *HOXA1*$^{+}$. 51
FIGURE 14: LA VOIE BMP JOUE UN ROLE CRUCIAL DANS LA DIFFERENCIATION DES CARDIOMYOCYTES 53
FIGURE 15 : LES VOIES DE SIGNALISATION DANS LE MICROENVIRONNEMENT PHARYNGE. 57
FIGURE 16 : LES GENES DES VOIES DE SIGNALISATION DANS LE SOFT ET DU IOFT. 60
FIGURE 17 : LA TETRALOGIE DE FALLOT (TOF) ; EXEMPLE RESULTANT D'UN DEVELOPPEMENT DEFECTUEUX DU SHF. 63
FIGURE 18 : TABLEAU DES DEFAUTS CONGENITAUX LIE A L'OBESITE MATERNELLE 72
FIGURE 19 : STRUCTURE MITOCHONDRIALE 78
FIGURE 20 : VUE D'ENSEMBLE DES DIFFERENTES VOIES METABOLIQUES CONTRIBUANT A LA PRODUCTION D'ATP DANS LES CARDIOMYOCYTES 81
FIGURE 21 : CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE ET PHOSPHORYLATION OXYDATIVE 84
FIGURE 22 : MATURATION MITOCHONDRIALE 88
FIGURE 23 : ÉVOLUTION DES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PENDANT LA CARDIOGENESE 90
FIGURE 24 : MECANISME DE TRANSCRIPTION DES GENES PAR LES PPAR 93
FIGURE 25 : DISTRIBUTION ET FONCTION DE TROIS TYPES DE *PPARS* 94
FIGURE 26 : *PPARΓ* DANS L'ADIPOGENESE. 96
FIGURE 27 : ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DU SOFT ET DU IOFT. 100
FIGURE 28 : LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE *PGC-1A* : 104
FIGURE 29 : MOUSE MODEL OF HIGH FAT DIET-INDUCED MATERNAL OBESITY. 135
FIGURE 30 : CARDIAC MALFORMATIONS AT E15.5 IN EMBRYOS FROM HIGH-FAT DIET MOTHERS. 135
FIGURE 31 : EARLY EMBRYONIC LETHALITY OF HFD COLLECTED EMBRYOS, OFT ELONGATION IMPAIRMENT. 135
FIGURE 32 : EARLY EMBRYONIC LETHALITY OF HFD COLLECTED EMBRYOS. 136
FIGURE 33 : MASSE LIPIDIQUE POST-NATALE 142
FIGURE 34 : MODELE DE SOURIS MUTANT *MESP1-CRE; PPARΓ* $^{FL/FL}$ 146
FIGURE 35 : MALFORMATIONS CARDIAQUES A E15.5 CHEZ LES EMBRYONS PROVENANT DE MERES HFD DE FONDS GENETIQUES DIFFERENTS. 151
FIGURE 36 : MARQUAGE OIL RED O SUR LES CŒURS A E15.5. 153
FIGURE 37 : MALFORMATIONS CARDIAQUES POST NATALE. 156
FIGURE 38 : UTILISATION DES SUBSTRATS SUR L'ACTIVATION ET L'INHIBITION DES COMPLEXES DE L'ECT. 162
FIGURE 39 : DETECTION DES CHANGEMENTS FONCTIONNELS DES MITOCHONDRIES AU STADE E9.0 ET E9.5 DANS LES VENTRICULES 163
FIGURE 40 : DETECTION DES CHANGEMENTS FONCTIONNELS DES MITOCHONDRIES A E10.5 DANS LES VENTRICULES ET L'OFT 165
FIGURE 41 : FIGURE RECAPITULATIVE. 185

Liste des Tableaux

TABLE1. AMORCES PCR ET TAILLE DE L'AMPLICON POUR LE GENOTYPAGE 113
TABLE 2. LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES POUR L'IMMUNOMARQUAGE 113

Bibliographie

Abassi H, Huguet H, Picot MC, Vincenti M, Guillaumont S, Auer A, Werner O, De La Villeon G, Lavastre K, Gavotto A, Auquier P, Amedro P. Health-related quality of life in children with congenital heart disease aged 5 to 7 years: a multicentre controlled cross-sectional study. Health Qual Life Outcomes. 2020 Nov 12;18(1):366. doi: 10.1186/s12955-020-01615-6. PMID: 33183312; PMCID: PMC7659069.

Abdulla T, Luna-Zurita L, de la Pompa JL, Schleich JM, Summers R. Epithelial to mesenchymal transition-the roles of cell morphology, labile adhesion and junctional coupling. Comput Methods Programs Biomed. 2013 Aug;111(2):435-46. doi: 10.1016/j.cmpb.2013.05.018. Epub 2013 Jun 18. PMID: 23787029.

Ackerman WE 4th, Zhang XL, Rovin BH, Kniss DA. Modulation of cytokine-induced cyclooxygenase 2 expression by PPARG ligands through NFkappaB signal disruption in human WISH and amnion cells. Biol Reprod. 2005 Sep;73(3):527-35. doi: 10.1095/biolreprod.104.039032. Epub 2005 Apr 20. PMID: 15843495; PMCID: PMC1360652.

Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. Nat Med. 2013 May;19(5):557-66. doi: 10.1038/nm.3159. Epub 2013 May 7. PMID: 23652116; PMCID: PMC3870016.

Ahuja, P., Sdek, P., MacLellan, W.R., 2007. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration. Physiol. Rev. 87, 521–544.

Alfano D, Altomonte A, Cortes C, Bilio M, Kelly RG, Baldini A. Tbx1 regulates extracellular matrix-cell interactions in the second heart field. Hum Mol Genet. 2019 Jul 15;28(14):2295-2308. doi: 10.1093/hmg/ddz058. PMID: 31180501.

Althali NJ, Hentges KE. Aperçus génétiques de la tétralogie non syndromique de Fallot. Front Physiol. 6 octobre 2022;13:1012665. DOI : 10.3389/fphys.2022.1012665. PMID : 36277185 ; PMCID : PMC9582763.

Alverson CJ, Strickland MJ, Gilboa SM, Correa A. Maternal smoking and congenital heart defects in the Baltimore-Washington Infant Study. Pediatrics. 2011 Mar;127(3):e647-53. doi: 10.1542/peds.2010-1399. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21357347.

Amundsen AL, Khoury J, Iversen PO, Bergei C, Ose L, Tonstad S, Retterstøl K. Marked changes in plasma lipids and lipoproteins during pregnancy in women with familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis. 2006 Dec;189(2):451-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.01.002. Epub 2006 Feb 8. PMID: 16466729.

Andersen P, Tampakakis E, Jimenez DV, Kannan S, Miyamoto M, Shin HK, Saberi A, Murphy S, Sulistio E, Chelko SP, Kwon C. Precardiac organoids form two heart fields via Bmp/Wnt signaling. Nat Commun. 2018 Aug 7;9(1):3140. doi: 10.1038/s41467-018-05604-8. PMID: 30087351; PMCID: PMC6081372.

Anderson RH, Brown NA, Webb S. Development and structure of the atrial septum. Heart. 2002 Jul;88(1):104-10. doi: 10.1136/heart.88.1.104. PMID: 12067964; PMCID: PMC1767197.

Anderson RH, Tretter JT, Spicer DE, Mori S. The Fate of the Outflow Tract Septal Complex in Relation to the Classification of Ventricular Septal Defects. J Cardiovasc Dev Dis. 2019 Feb 21;6(1):9. doi: 10.3390/jcdd6010009. PMID: 30795606; PMCID: PMC6463070

Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. Development. 2011 Sep;138(17):3593-612. doi: 10.1242/dev.063610. PMID: 21828089.

Arima, Y., Miyagawa-Tomita, S., Maeda, K., Asai, R., Seya, D., Minoux, M., Rijli, F.M.,Nishiyama, K., Kim, K.-S., Uchijima, Y., Ogawa, H., Kurihara, Y., Kurihara, H., 2012.Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. Nat. Commun. 3.

Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(2):91–103. https://doi.org/10.1038/ nrm2618

Baardman ME, Kerstjens-Frederikse WS, Berger RM, Bakker MK, Hofstra RM, Plösch T. The role of maternal-fetal cholesterol transport in early fetal life: current insights. Biol Reprod. 2013 Jan 31;88(1):24. doi: 10.1095/biolreprod.112.102442. PMID: 23153566.

Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Mol Cell. 1999 Oct;4(4):585-95. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80209-9. PMID: 10549290.

Barak Y, Sadovsky Y, Shalom-Barak T. PPAR Signaling in Placental Development and Function. PPAR Res. 2008;2008:142082. doi: 10.1155/2008/142082. PMID: 18288278; PMCID: PMC2225458.

Barger, P. M., & Kelly, D. P. (2000, August). PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. Trends in Cardiovascular Medicine. https://doi.org/10.1016/S1050 1738(00)00077-3.

Benador, I. Y. et al. Mitochondria bound to lipid droplets have unique bioenergetics, composition, and dynamics that support lipid droplet expansion. Cell Metab. 27, 869–885.e6 (2018).

Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. Annu Rev Med. 2002;53:409-35. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104018. PMID: 11818483.

Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, Kellis M, Marra MA, Beaudet AL, Ecker JR, Farnham PJ, Hirst M, Lander ES, Mikkelsen TS, Thomson JA. Le consortium de cartographie épigénomique de la feuille de route des NIH. Nat Biotechnol. octobre 2010 ; 28(10):1045-8. DOI : 10.1038/NBT1010-1045. PMID : 20944595 ; PMCID : PMC3607281.

Bertrand N, Roux M, Ryckebüsch L, Niederreither K, Dollé P, Moon A, Capecchi M, Zaffran S (2011) Hox genes define distinct progenitor sub-domains within the second heart field. Dev Biol 353(2):266–274

Biggs SE, Gilchrist B, May KR. Délétion du chromosome 22q11.2 (syndrome de DiGeorge) : caractéristiques immunologiques, diagnostic et prise en charge. Curr Allergie Asthme Rep. 2023 avril ; 23(4):213-222. DOI : 10.1007/S11882-023-01071-4. Epub 10 mars 2023. PMID : 36897497 ; PMCID : PMC9999075.

Bisson JA, Mills B, Paul Helt JC, Zwaka TP, Cohen ED. Wnt5a and Wnt11 inhibit the canonical Wnt pathway and promote cardiac progenitor development via the Caspase-dependent degradation of AKT. Dev Biol. 2015;398(1):80–96. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.11.015.

Bodmer R. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in Drosophila. Development. 1993 Jul;118(3):719-29. doi: 10.1242/dev.118.3.719. PMID: 7915669.

Bogacka I, Gettys TW, de Jonge L, Nguyen T, Smith JM, Xie H, Greenway F, Smith SR. The effect of beta-adrenergic and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulation on target genes related to lipid metabolism in human subcutaneous adipose tissue. Diabetes Care. 2007 May;30(5):1179-86. doi: 10.2337/dc06-1962. Epub 2007 Mar 10. PMID: 17351280.

Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes related to lipid storage in vivo. Diabetes Care. 2004 Jul;27(7):1660-7. doi: 10.2337/diacare.27.7.1660. PMID: 15220243.

Boskovski MT, Yuan S, Pedersen NB, Goth CK, Makova S, Clausen H, Brueckner M, Khokha MK. The heterotaxy gene GALNT11 glycosylates Notch to orchestrate cilia type

and laterality. Nature. 2013 Dec 19;504(7480):456-9. doi: 10.1038/nature12723. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24226769; PMCID: PMC3869867.

Bosma M, Dapito DH, Drosatos-Tampakaki Z, Huiping-Son N, Huang LS, Kersten S, Drosatos K, Goldberg IJ. Sequestration of fatty acids in triglycerides prevents endoplasmic reticulum stress in an in vitro model of cardiomyocyte lipotoxicity. Biochim Biophys Acta. 2014 Dec;1841(12):1648-55. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.09.012. PMID: 25251292; PMCID: PMC4342292.

Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX, Aziz S, Johnson JI, Bugger H, Zaha VG, Abel ED. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. Diabetes. 2007 Oct;56(10):2457-66. doi: 10.2337/db07-0481. Epub 2007 Jul 10. PMID: 17623815.

Bourges I, Ramus C, Mousson de Camaret B, Beugnot R, Remacle C, Cardol P, Hofhaus G, Issartel JP. Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. Biochem J. 2004 Nov 1;383(Pt. 3):491-9. doi: 10.1042/BJ20040256. PMID: 15250827; PMCID: PMC1133742.

Brand, T. (2003). "Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis." Dev Biol 258(1): 1-19.

Bruneau, B.G., 2013. Signaling and Transcriptional Networks in Heart Development and Regeneration. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5, a008292–a008292.

Buckberg G, Mahajan A, Saleh S, Hoffman JI, Coghlan C. Structure and function relationships of the helical ventricular myocardial band. J Thorac Cardiovasc Surg. 2008 Sep;136(3):578-89, 589.e1-11. doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.10.088. Epub 2008 Jun 5. PMID: 18805255.

Buckberg GD, Nanda NC, Nguyen C, Kocica MJ. What Is the Heart? Anatomy, Function, Pathophysiology, and Misconceptions. J Cardiovasc Dev Dis. 2018 Jun 4;5(2):33. doi: 10.3390/jcdd5020033. PMID: 29867011; PMCID: PMC6023278.

Buckingham, M., Meilhac, S. & Zaffran, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6, 826–835 (2005).

Buijtendijk, M.F.J., Barnett, P. and van den Hoff, M.J.B. (2020) Development of the human heart. Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet. 184, 7–22 https://doi.org/10.1002/ajmg.c.31778.

Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. Br J Nutr. 2007 Mar;97(3):435-9. doi: 10.1017/S0007114507352392. PMID: 17313703; PMCID: PMC2211514.

Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. Dev Cell. 2003;5(6):877–89. https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03) 00363-0.

Cano, E., Carmona, R., Ruiz-Villalba, A., Rojas, A., Chau, Y.-Y., Wagner, K.D., Wagner, N.,Hastie, N.D., Muñoz-Chápuli, R., Pérez-Pomares, J.M., 2016. Extracardiac septum transversum/proepicardial endothelial cells pattern embryonic coronary arterio–venous connections. Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 656–661.

Chang JS, Ha K. Un PPAR gamma 2 tronqué se localise dans les mitochondries et régule la respiration mitochondriale dans les adipocytes bruns. PLoS One. 22 mars 2018 ; 13(3) :e0195007. DOI : 10.1371/journal.pone.0195007. PMID : 29566074 ; PMCID : PMC5864067.

Chen L, Fulcoli FG, Tang S, Baldini A. Tbx1 regulates proliferation and differentiation of multipotent heart progenitors. Circ Res. 2009 Oct 23;105(9):842-51. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200295. Epub 2009 Sep 10. PMID: 19745164; PMCID: PMC2796444.

Chiang AN, Yang ML, Hung JH, Chou P, Shyn SK, Ng HT. Alterations of serum lipid levels and their biological relevances during and after pregnancy. Life Sci. 1995;56(26):2367-75. doi: 10.1016/0024-3205(95)00230-4. PMID: 7791523.

Chow, R.W.-Y., Fukui, H., Chan, W.X., Tan, K.S.J., Roth, S., Duchemin, A.-L. et al (2022) Cardiac forces regulate zebrafish heart valve delamination by modulating Nfat signaling. PLoS Biol. 20, e3001505 https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001505.

Clark CD, Zhang B, Lee B, Evans SI, Lassar AB, Lee KH. Evolutionary conservation of Nkx2.5 autoregulation in the second heart field. Dev Biol. 2013 Feb 1;374(1):198-209. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.11.007. Epub 2012 Nov 17. PMID: 23165293; PMCID: PMC3549048.

Cohen ED, Miller MF, Wang Z, Moon RT, Morrisey EE. Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. Development. 2012;139(11):1931–40. https://doi.org/10. 1242/dev.069377.

Cohen ED, Wang Z, Lepore JJ, Lu MM, Taketo MM, Epstein DJ, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes expansion of Isl-1- positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling. J Clin Invest. 2007;117(7):1794–804. https://doi.org/10.1172/ JCI31731.

Corona JC, Duchen MR. PPARγ as a therapeutic target to rescue mitochondrial function in neurological disease. Free Radic Biol Med. 2016 Nov;100:153-163. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.023. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27352979; PMCID: PMC5145801.

Courtney JA, Cnota JF, Jones HN. The Role of Abnormal Placentation in Congenital Heart Disease; Cause, Correlate, or Consequence?Front Physiol. 7 août 2018 ;9 :1045. DOI : 10.3389/fphys.2018.01045. PMID : 30131711 ; PMCID : PMC6091057.

Cui, C., et al., Dynamic positional fate map of the primary heart-forming region. Dev Biol, 2009. 332(2): p. 212-22.

De Bono C; C. Thellier; N. Bertrand; R. Sturny; E. Jullian; C. Cortes; S. Stefanovic; S. Zaffran; M. Theveniau-Ruissy; R. G. Kelly T-box genes and retinoic acid signaling regulate the segregation of arterial and venous pole progenitor cells in the murine second heart field*, Hum. Mol. Genet.*, Volume 27 (2018), pp. 3747-3760

de Pater E, Ciampricotti M, Priller F, Veerkamp J, Strate I, Smith K, Lagendijk AK, Schilling TF, Herzog W, Abdelilah-Seyfried S, Hammerschmidt M, Bakkers J. Bmp signaling exerts opposite effects on cardiac differentiation. Circ Res. 2012 Feb 17;110(4):578-87. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.261172. Epub 2012 Jan 12. PMID: 22247485; PMCID: PMC4924880.

del Monte-Nieto, G., Ramialison, M., Adam, A.A.S., Wu, B., Aharonov, A., D'Uva, G. et al (2018) Control of cardiac jelly dynamics by NOTCH1 and NRG1 defines the building plan for trabeculation. Nature 557, 439–445 https://doi.org/10.1038/s41586-018-0110-6.

Desgrange, A., Le Garrec, J.-F. and Meilhac, S.M. (2018) Left-right asymmetry in heart development and disease: forming the right loop. Development 145, dev162776 https://doi.org/10.1242/dev.162776.

Desgrange, A., Le Garrec, J.-F., Bernheim, S., Bønnelykke, T.H. and Meilhac, S.M. (2020) Transient nodal signaling in left precursors coordinates opposed asymmetries shaping the heart loop. Dev. Cell 55, 413–431.e6 https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.008.

Devine W Patrick, Joshua D Wythe, Matthew George, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Benoit G Bruneau (2014) Early patterning and specification of cardiac progenitors in gastrulating mesoderm eLife 3:e03848.

Di Felice V, Zummo G. Tetralogy of fallot as a model to study cardiac progenitor cell migration and differentiation during heart development. Trends Cardiovasc Med. 2009 May;19(4):130-5. doi: 10.1016/j.tcm.2009.07.004. PMID: 19818949.

Ding G, Fu M, Qin Q, Lewis W, Kim HW, Fukai T, Bacanamwo M, Chen YE, Schneider MD, Mangelsdorf DJ, Evans RM, Yang Q. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. Cardiovasc Res. 2007 Nov 1;76(2):269-79. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.06.027. Epub 2007 Jul 4. PMID: 17678635.

Ding Q, Qi Y, Tsang SY. Biogenèse mitochondriale, dynamique mitochondriale et mitophagie dans la maturation des cardiomyocytes. Cellules. 18 septembre 2021 ; 10(9):2463. DOI : 10.3390/cells10092463. PMID : 34572112 ; PMCID : PMC8466139.

Diogo, R., Kelly, R., Christiaen, L. *et al.* A new heart for a new head in vertebrate cardiopharyngeal evolution. *Nature* 520, 466–473 (2015).

discontinuous formation of coronary vessels. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 9504–9508.

Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, Xu SM, Black BL (2004) Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. Development 131(16):3931–3942

Dorn GW 2nd, Vega RB, Kelly DP. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart. Genes Dev. 2015 Oct 1;29(19):1981-91. doi: 10.1101/gad.269894.115. PMID: 26443844; PMCID: PMC4604339.

Duan SZ, Ivashchenko CY, Russell MW, Milstone DS, Mortensen RM. Cardiomyocyte-specific knockout and agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma both induce cardiac hypertrophy in mice. Circ Res. 2005 Aug 19;97(4):372-9. doi: 10.1161/01.RES.0000179226.34112.6d. Epub 2005 Jul 28. PMID: 16051889.

Dubois V, Eeckhoute J, Lefebvre P, Staels B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. J Clin Invest. 2017 Apr 3;127(4):1202-1214. doi: 10.1172/JCI88894. Epub 2017 Apr 3. PMID: 28368286; PMCID: PMC5373878.

Dyer LA, Kirby ML. Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation. Dev Biol. 2009 Jun 15;330(2):305-17. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.03.028. Epub 2009 Apr 8. PMID: 19361493; PMCID: PMC2810612.

Dyer LA, Makadia FA, Scott A, Pegram K, Hutson MR, Kirby ML. BMP signaling modulates hedgehog-induced secondary heart field proliferation. Dev Biol. 2010 Dec 15;348(2):167-76. doi: 10.1016/j.ydbio.2010.09.021. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20920499; PMCID: PMC2982885.

Ebelt H, Hillebrand I, Arlt S, Zhang Y, Kostin S, Neuhaus H, Müller-Werdan U, Schwarz E, Werdan K, Braun T. Treatment with bone morphogenetic protein 2 limits infarct size after myocardial infarction in mice. Shock. 2013 Apr;39(4):353-60. doi: 10.1097/SHK.0b013e318289728a. PMID: 23376954.

Eckel-Mahan KL, Patel VR, de Mateo S, Orozco-Solis R, Ceglia NJ, Sahar S, Dilag-Penilla SA, Dyar KA, Baldi P, Sassone-Corsi P. Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. Cell. 2013 Dec 19;155(7):1464-78. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.034. PMID: 24360271; PMCID: PMC4573395.

Eisenberg, L.M., Markwald, R.R., 1995. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. Circ Res 77, 1-6.

El Hajj N, Schneider E, Lehnen H, Haaf T. Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment. Reproduction. 2014 Dec;148(6):R111-20. doi: 10.1530/REP-14-0334. Epub 2014 Sep 3. PMID: 25187623; PMCID: PMC4241689.

Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC. Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene. Hum Mol Genet. 2001 Jan 15;10(2):163-9. doi: 10.1093/hmg/10.2.163. PMID: 11152664.

Euler G. Bons et mauvais côtés de la signalisation TGFβ dans l'infarctus du myocarde. Front Physiol. 4 mars 2015;6:66. DOI : 10.3389/fphys.2015.00066. PMID : 25788886 ; PMCID : PMC4349055.

Faber, J.W., Boukens, B.J., Oostra, R.-J., Moorman, A.F.M., Christoffels, V.M. and Jensen, B. (2019) Sinus venosus incorporation: contentious issues and operational criteria for developmental and evolutionary studies. J. Anat. 234, 583–591 https://doi.org/10.1111/joa.12962.

Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. J Clin Invest. 2006 Mar;116(3):615-22. doi: 10.1172/JCI27794. PMID: 16511594; PMCID: PMC1386111.

Gallardo-Soler A, Gómez-Nieto C, Campo ML, Marathe C, Tontonoz P, Castrillo A, Corraliza I. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. Mol Endocrinol. 2008 Jun;22(6):1394-402. doi: 10.1210/me.2007-0525. Epub 2008 Mar 6. PMID: 18323470; PMCID: PMC5419540.

Garcia-Fuentes E, Murri M, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, García-Almeida JM, Moreno-Santos I, Tinahones FJ, Macias-Gonzalez M. PPARgamma expression after a high-fat meal is associated with plasma superoxide dismutase activity in morbidly obese persons. Obesity (Silver Spring). 2010 May;18(5):952-8. doi: 10.1038/oby.2009.314. Epub 2009 Oct 8. PMID: 19816416.

Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. Nature. 2005 Sep 8;437(7056):270-4. doi: 10.1038/nature03940. Epub 2005 Jul 17. PMID: 16025100.

Garnier A, Fortin D, Deloménie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Facteurs de transcription mitochondriaux déprimés et capacité oxydative chez les muscles cardiaques et squelettiques défaillants chez le rat. J Physiol. 1er septembre 2003 ; 551(Pt 2) :491 à 501. DOI : 10.1113/jphysiol.2003.045104. Epub 24 juin 2003. PMID : 12824444 ; PMCID : PMC2343221.

Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020 Apr;21(4):204-224. doi: 10.1038/s41580-020-0210-7. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32071438.

Gilboa SM, Correa A, Botto LD, Rasmussen SA, Waller DK, Hobbs CA, Cleves MA, Riehle-Colarusso TJ; National Birth Defects Prevention Study. Association between prepregnancy body mass index and congenital heart defects. Am J Obstet Gynecol. 2010 Jan;202(1):51.e1-51.e10. doi: 10.1016/j.ajog.2009.08.005. Epub 2009 Oct 1. PMID: 19796755.

Goddeeris MM, Schwartz R, Klingensmith J, Meyers EN. Independent requirements for Hedgehog signaling by both the anterior heart field and neural crest cells for outflow tract development. Development. 2007 Apr;134(8):1593-604. doi: 10.1242/dev.02824. Epub 2007 Mar 7. PMID: 17344228.

Goldmuntz E, Geiger E, Benson DW. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. Circulation. 2001 Nov 20;104(21):2565-8. doi: 10.1161/hc4601.098427. PMID: 11714651.

Gross B, Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. Nat Rev Endocrinol. 2017 Jan;13(1):36-49. doi: 10.1038/nrendo.2016.135. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27636730.

Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. Nutr J. 2014 Feb 14;13:17. doi: 10.1186/1475-2891-13-17. PMID: 24524207; PMCID: PMC3943808.

Ha EE, Bauer RC. Emerging Roles for Adipose Tissue in Cardiovascular Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Aug;38(8):e137-e144. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311421. PMID: 30354196; PMCID: PMC6205733.

Hausman GJ, Hausman DB. Search for the preadipocyte progenitor cell. J Clin Invest. 2006 Dec;116(12):3103-6. doi: 10.1172/JCI30666. PMID: 17143324; PMCID: PMC1679717.

High FA, Jain R, Stoller JZ, Antonucci NB, Lu MM, Loomes KM, Kaestner KH, Pear WS, Epstein JA. Murine jagged1/notch signaling in the second heart field orchestrates fgf8 expression and tissue-tissue interactions during outflow tract development. *J Clin Invest*. 2009;119:1986-1996

Hildreth, V., S. Webb, et al. (2008). "Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart." J Anat 212(1): 1-11.

Hoffmann AD, Peterson MA, Friedland-Little JM, Anderson SA, Moskowitz IP. sonic hedgehog is required in pulmonary endoderm for atrial septation. Development. 2009 May;136(10):1761-70. doi: 10.1242/dev.034157. Epub 2009 Apr 15. PMID: 19369393; PMCID: PMC2673765.

Hom JR, Quintanilla RA, Hoffman DL, de Mesy Bentley KL, Molkentin JD, Sheu SS, Porter GA Jr. The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. Dev Cell. 2011 Sep 13;21(3):469-78. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.008. Erratum in: Dev Cell. 2011 Nov 15;21(5):975. PMID: 21920313; PMCID: PMC3175092.

House SL, House BE, Glascock B, Kimball T, Nusayr E, Schultz JE, Doetschman T. Fibroblast Growth Factor 2 Mediates Isoproterenol-induced Cardiac Hypertrophy through Activation of the Extracellular Regulated Kinase. Mol Cell Pharmacol. 2010;2(4):143-154. doi: 10.4255/mcpharmacol.10.20. PMID: 21274419; PMCID: PMC3026329.

Hu W, Dong A, Karasaki K, Sogabe S, Okamoto D, Saigo M, Ishida M, Yoshizumi M, Kokubo H. Smad4 regulates the nuclear translocation of Nkx2-5 in cardiac differentiation. Sci Rep. 2021 Feb 11;11(1):3588. doi: 10.1038/s41598-021-82954-2. PMID: 33574455; PMCID: PMC7878807.

Hubert F, Payan SM, Rochais F. FGF10 Signaling in Heart Development, Homeostasis, Disease and Repair. Front Genet. 2018 Nov 28;9:599. doi: 10.3389/fgene.2018.00599. PMID: 30546382; PMCID: PMC6279889.

Hutson MR, Zeng XL, Kim AJ, Antoon E, Harward S, Kirby ML. Les progéniteurs des pôles artériels interprètent les signaux FGF/BMP opposés pour proliférer ou se différencier. Développement. Septembre 2010 ; 137(18):3001-11. DOI : 10.1242/dev.051565. Epub 11 août 2010. PMID : 20702561 ; PMCID : PMC2926953.

Hutson, M. R. and M. L. Kirby (2007). "Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations." Semin Cell Dev Biol 18(1): 101-10.

Ilagan R, Abu-Issa R, Brown D, Yang YP, Jiao K, Schwartz RJ, et al. Fgf8 is required for anterior heart field development. Development. 2006;133(12):2435–45. https://doi.org/10.1242/ dev.02408.

Itoh K, Nakamura K, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. Trends Cell Biol. 2013 Feb;23(2):64-71. doi: 10.1016/j.tcb.2012.10.006. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23159640; PMCID: PMC3558617.

Ivanovitch K, Soro-Barrio P, Chakravarty P, Jones RA, Bell DM, et al. (2021) Ventricular, atrial, and outflow tract heart progenitors arise from spatially and molecularly distinct regions of the primitive streak. PLOS Biology 19(5): e3001200.

Ivanovitch, K., Temiño, S. and Torres, M. (2017) Live imaging of heart tube development in mouse reveals alternating phases of cardiac differentiation and morphogenesis. eLife 6, e30668 https://doi.org/10.7554/eLife.30668.

Jain R, Li D, Gupta M, Manderfield LJ, Ifkovits JL, Wang Q, et al. HEART DEVELOPMENT. Integration of Bmp and Wnt signaling by Hopx specifies commitment of cardiomyoblasts. Science. 2015;348(6242):aaa6071. https://doi.org/10.1126/science. aaa607

Jaishy B, Zhang Q, Chung HS, Riehle C, Soto J, Jenkins S, Abel P, Cowart LA, Van Eyk JE, Abel ED. Lipid-induced NOX2 activation inhibits autophagic flux by impairing lysosomal enzyme activity. J Lipid Res. 2015 Mar;56(3):546-561. doi: 10.1194/jlr.M055152. Epub 2014 Dec 21. PMID: 25529920; PMCID: PMC4340303.

Jauniaux E, Cindrova-Davies T, Johns J, Dunster C, Hempstock J, Kelly FJ, Burton GJ. Distribution and transfer pathways of antioxidant molecules inside the first trimester human gestational sac. J Clin Endocrinol Metab. 2004 Mar;89(3):1452-8. doi: 10.1210/jc.2003-031332. PMID: 15001647.

Jauniaux E, Gulbis B. Fluid compartments of the embryonic environment. Hum Reprod Update. 2000 May-Jun;6(3):268-78. doi: 10.1093/humupd/6.3.268. PMID: 10874572.

Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. Nat Genet. 2001 Mar;27(3):286-91. doi: 10.1038/85845. PMID: 11242110.

Jiao K, Kulessa H, Tompkins K, Zhou Y, Batts L, Baldwin HS, Hogan BL. An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart. Genes Dev. 2003 Oct 1;17(19):2362-7. doi: 10.1101/gad.1124803. Epub 2003 Sep 15. PMID: 12975322; PMCID: PMC218073.

Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, Plösch T. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. Biochimie. 2012 Nov;94(11):2242-63. doi: 10.1016/j.biochi.2012.06.012. Epub 2012 Jul 5. PMID: 22771843.

Jin H, Wang H, Li J, Yu S, Xu M, Qiu Z, Xia M, Zhu J, Feng Q, Xie J et al (2019) Differential contribution of the two waves of cardiac progenitors and their derivatives to aorta and pulmonary artery. Dev Biol 450(2):82–89

Jing Y, Ren Y, Witzel HR, Dobreva G. A BMP4-p38 MAPK signaling axis controls ISL1 protein stability and activity during cardiogenesis. Stem Cell Reports. 2021 Aug 10;16(8):1894-1905. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.06.017. Epub 2021 Jul 29. PMID: 34329593; PMCID: PMC8365108.

Kadam L, Kohan-Ghadr HR, Drewlo S. The balancing act - PPAR-γ's roles at the maternal-fetal interface. Syst Biol Reprod Med. 2015 Apr;61(2):65-71. doi: 10.3109/19396368.2014.991881. Epub 2014 Dec 5. PMID: 25475254; PMCID: PMC6364849.

Kageyama R, Ohtsuka T, Tomita K. The bHLH gene Hes1 regulates differentiation of multiple cell types. Mol Cells. 2000 Feb 29;10(1):1-7. doi: 10.1007/s10059-000-0001-0. PMID: 10774739.

Kalisch-Smith JI, Ved N, Sparrow DB. Environmental Risk Factors for Congenital Heart Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2020 Mar 2;12(3):a037234. doi: 10.1101/cshperspect.a037234. PMID: 31548181; PMCID: PMC7050589.

Kampjut D, Sazanov LA (2020) The coupling mechanism of mammalian respiratory complex I. *Science* 370: eabc4209

Karunamuni G, Gu S, Doughman YQ, Peterson LM, Mai K, McHale Q, Jenkins MW, Linask KK, Rollins AM, Watanabe M. Ethanol exposure alters early cardiac function in the looping heart: a mechanism for congenital heart defects? Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014

Feb;306(3):H414-21. doi: 10.1152/ajpheart.00600.2013. Epub 2013 Nov 22. PMID: 24271490; PMCID: PMC3920145.

Karwi QG, Uddin GM, Ho KL, Lopaschuk GD. Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart. Front Cardiovasc Med. 2018 Jun 6;5:68. doi: 10.3389/fcvm.2018.00068. PMID: 29928647; PMCID: PMC5997788.

Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Jun 1;8(6):a021899. doi: 10.1101/cshperspect.a021899. PMID: 27252362; PMCID: PMC4888821.

Kawahira, N., Ohtsuka, D., Kida, N., Hironaka, K. and Morishita, Y. (2020) Quantitative analysis of 3D tissue deformation reveals key cellular mechanism associated with initial heart looping. Cell Rep. 30, 3889–3903.e5 https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.071.

Kelly RG, Buckingham ME, Moorman AF. Heart fields and cardiac morphogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 Oct 1;4(10):a015750. doi: 10.1101/cshperspect.a015750. PMID: 25274757; PMCID: PMC4200205.

Kelly RG, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE. The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomeric myogenesis. Hum Mol Genet. 2004 Nov 15;13(22):2829-40. doi: 10.1093/hmg/ddh304. Epub 2004 Sep 22. PMID: 15385444.

Kelly, R.G., 2012. The second heart field. Curr Top Dev Biol 100, 33-65.

Kelly, R.G., Brown, N.A., Buckingham, M.E., 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. Dev Cell 1, 435-440.

Kelly, R.G., Buckingham, M.E., 2002. The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. Trends Genet. 18, 210–216. https://doi.org/10.1016/S0168-9525(02)02642-2.

Kemp C, Willems E, Abdo S, Lambiv L, Leyns L. Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and postimplantation development. Dev Dyn. 2005 Jul;233(3):1064-75. doi: 10.1002/dvdy.20408. PMID: 15880404.

Klaus A, Saga Y, Taketo MM, Tzahor E, Birchmeier W. Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Nov 20;104(47):18531-6. doi: 10.1073/pnas.0703113104. Epub 2007 Nov 13. PMID: 18000065; PMCID: PMC2141811.

Lage K., Greenway S.C., Rosenfeld J.A., Wakimoto H., Gorham J.M., Segre A.V., Roberts A.E., Smoot L.B., Pu W.T.C., Pereira A., et al. Genetic and environmental risk factors in

congenital heart disease functionally converge in protein networks driving heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:14035–14040. doi: 10.1073/pnas.1210730109.

Lappas M, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE. Regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-PGJ(2) and troglitazone. J Clin Endocrinol Metab. 2002 Oct;87(10):4667-72. doi: 10.1210/jc.2002-020613. PMID: 12364456.

Lawson, K.A., J.J. Meneses, and R.A. Pedersen, Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. Development, 1991. 113(3): p. 891-911.

Le Garrec, J.-F., Domínguez, J.N., Desgrange, A., Ivanovitch, K.D., Raphaël, E., Bangham, J.A. et al (2017) A predictive model of asymmetric morphogenesis from 3D reconstructions of mouse heart looping dynamics. eLife 6, e28951 https://doi.org/10.7554/eLife.28951.

Lee LJ, Lupo PJ. Maternal smoking during pregnancy and the risk of congenital heart defects in offspring: a systematic review and metaanalysis. Pediatr Cardiol. 2013 Feb;34(2):398-407. doi: 10.1007/s00246-012-0470-x. Epub 2012 Aug 12. PMID: 22886364.

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. J Clin Invest. 2000 Oct;106(7):847-56. doi: 10.1172/JCI10268. PMID: 11018072; PMCID: PMC517815.

Lendvai Á, Deutsch MJ, Plösch T, Ensenauer R. The peroxisome proliferator-activated receptors under epigenetic control in placental metabolism and fetal development. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2016 May 15;310(10):E797-810. doi: 10.1152/ajpendo.00372.2015. Epub 2016 Feb 9. PMID: 26860983.

Lescroart, F., Chabab, S., Lin, X., Rulands, S., Paulissen, C., Rodolosse, A., Auer, H., Achouri, Y., Dubois, C., Bondue, A., Simons, B.D., Blanpain, C., 2014. Early lineage restriction in temporally distinct populations of Mesp1 progenitors during mammalian heart development. Nature cell biology 16, 829-840.

Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont ME, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. Nat Genet. 1997 Jul;16(3):243-51. doi: 10.1038/ng0797-243. PMID: 9207788.

Li P, Pashmforoush M, Sucov HM (2010) Retinoic acid regulates differentiation of the secondary heart field and TGFbeta-mediated outflow tract septation. Dev Cell 18(3):480–485

Li Y., Klena N.T., Gabriel G.C., Liu X., Kim A.J., Lemke K., Chen Y., Chatterjee B., Devine W., Damerla R.R., et al. Global genetic analysis in mice unveils central role for cilia in congenital heart disease. *Nature.* 2015;521:520–524. doi: 10.1038/nature14269.

Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. J Nutr. 2005 Jun;135(6):1382-6. doi: 10.1093/jn/135.6.1382. PMID: 15930441.

Lin DS, Pitkin RM, Connor WE. Placental transfer of cholesterol into the human fetus. Am J Obstet Gynecol. 1977 Aug 1;128(7):735-9. doi: 10.1016/0002-9378(77)90713-x. PMID: 879241.

Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature. 2002 Aug 15;418(6899):797-801. doi: 10.1038/nature00904. PMID: 12181572.

Lioux G, Liu X, Temiño S, Oxendine M, Ayala E, Ortega S, Kelly RG, Oliver G, Torres M (2020) A second heart field-derived vasculogenic niche contributes to cardiac lymphatics. Dev Cell 52(3):350-363.e6.

Liu J, Cheng H, Xiang M, Zhou L, Wu B, Moskowitz IP, Zhang K, Xie L. Gata4 regulates hedgehog signaling and Gata6 expression for outflow tract development. PLoS Genet. 2019 May 23;15(5):e1007711. doi: 10.1371/journal.pgen.1007711. PMID: 31120883; PMCID: PMC6550424.

Liu W, Selever J, Wang D, Lu MF, Moses KA, Schwartz RJ, Martin JF. Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 30;101(13):4489-94. doi: 10.1073/pnas.0308466101. Epub 2004 Mar 19. PMID: 15070745; PMCID: PMC384774.

Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. J Cardiovasc Pharmacol. 2010 Aug;56(2):130-40. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181e74a14. PMID: 20505524.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. Physiol Rev. 2010 Jan;90(1):207-58. doi: 10.1152/physrev.00015.2009. PMID: 20086077.

Lotz C, Lin AJ, Black CM, Zhang J, Lau E, Deng N, Wang Y, Zong NC, Choi JH, Xu T, Liem DA, Korge P, Weiss JN, Hermjakob H, Yates JR 3rd, Apweiler R, Ping P. Characterization, design, and function of the mitochondrial proteome: from organs to organisms. J

Proteome Res. 2014 Feb 7;13(2):433-46. doi: 10.1021/pr400539j. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24070373; PMCID: PMC4076470.

Luo Z, Xu X, Sho T, Zhang J, Xu W, Yao J, Xu J. ROS-induced autophagy regulates porcine trophectoderm cell apoptosis, proliferation, and differentiation. Am J Physiol Cell Physiol. 2019 Feb 1;316(2):C198-C209. doi: 10.1152/ajpcell.00256.2018. Epub 2018 Nov 28. PMID: 30485137.

Luxán G, D'Amato G, MacGrogan D, de la Pompa JL. Endocardial Notch Signaling in Cardiac Development and Disease. Circ Res. 2016 Jan 8;118(1):e1-e18. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305350. Epub 2015 Dec 3. PMID: 26635389.

Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. Genes Dev. 1995 Jul 1;9(13):1654-66. doi: 10.1101/gad.9.13.1654. PMID: 7628699.

Macias-Gonzalez M, Moreno-Santos I, García-Almeida JM, Tinahones FJ, Garcia-Fuentes E. PPARgamma2 protects against obesity by means of a mechanism that mediates insulin resistance. Eur J Clin Invest. 2009 Nov;39(11):972-9. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02198.x. Epub 2009 Jul 23. PMID: 19645740.

Mackler B, Grace R, Duncan HM. Studies of mitochondrial development during embryogenesis in the rat. Arch Biochem Biophys. 1971 Jun;144(2):603-10. doi: 10.1016/0003-9861(71)90367-5. PMID: 4328160.

Maduro C, Castro LF, Moleiro ML, Guedes-Martins L. Diabète prégestationnel et malformations cardiaques congénitales. Rev Bras Ginecol Obstet. 2022 Oct ; 44(10):953-961. DOI : 10.1055/s-0042-1755458. EPUB 29 novembre 2022. PMID : 36446562 ; PMCID : PMC9708403.

Männer, J. and Yelbuz, T.M. (2019) Functional morphology of the cardiac jelly in the tubular heart of vertebrate embryos. J. Cardiovasc. Dev. Dis. 6, 12 https://doi.org/10.3390/jcdd6010012.

Manner, J., Perez-Pomares, J.M., Macias, D., Munoz-Chapuli, R., 2001. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. Cells Tissues Organs 169, 89-103.

Marchington JM, Mattacks CA, Pond CM. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties. Comp Biochem Physiol B. 1989;94(2):225-32. doi: 10.1016/0305-0491(89)90337-4. PMID: 2591189.

Marguerie A, Bajolle F, Zaffran S, Brown NA, Dickson C, Buckingham ME, et al. Congenital heart defects in Fgfr2-IIIb and Fgf10 mutant mice. Cardiovasc Res. 2006;71(1):50–60. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.03.021.

Martin G, Poirier H, Hennuyer N, Crombie D, Fruchart JC, Heyman RA, Besnard P, Auwerx J. Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective rexinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target. J Biol Chem. 2000 Apr 28;275(17):12612-8. doi: 10.1074/jbc.275.17.12612. PMID: 10777552.

Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. Genes Dev. 2001;15(3):316–27. https://doi.org/10. 1101/gad.855501

Mattie S., Riemer J., Wideman J.G. and McBride H.M. (2018). A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. J. Cell Biol. 217, 507-515

McCulley DJ, Kang JO, Martin JF, Black BL. BMP4 est nécessaire dans le champ cardiaque antérieur et ses dérivés pour le remodelage du coussin endocardique, la cloison de la voie d'écoulement et le développement de la valve semi-lunaire. Dev Dyn. novembre 2008 ; 237(11):3200-9. DOI : 10.1002/dvdy.21743. PMID : 18924235 ; PMCID : PMC2728547.

McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. Am J Hum Genet. 2006 Jul;79(1):169-73. doi: 10.1086/505332. Epub 2006 May 10. PMID: 16773578; PMCID: PMC1474136.

Meilhac SM, Lescroart F, Blanpain C, Buckingham ME. Cardiac cell lineages that form the heart. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 Sep 2;4(9):a013888. doi: 10.1101/cshperspect.a013888. Erratum in: Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Feb;5(2):a026344. Erratum in: Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 Feb 02;5(2):a026344. doi: 10.1101/cshperspect.a026344. PMID: 25183852; PMCID: PMC4143102.

Meilhac, S.M. and Buckingham, M.E. (2018) The deployment of cell lineages that form the mammalian heart. Nat. Rev. Cardiol. 15, 705–724 https://doi.org/10.1038/s41569-018-0086-9.

Mensah IK, Gowher H. Voies de signalisation régissant la différenciation des cardiomyocytes. Gènes (Bâle). 18 juin 2024 ; 15(6):798. DOI : 10.3390/genes15060798. PMID : 38927734 ; PMCID : PMC11202427.

Mikawa, T., Fischman, D.A., 1992. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis:

Miquerol L, Beyer S, Kelly RG. Establishment of the mouse ventricular conduction system. Cardiovasc Res. 2011 Jul 15;91(2):232-42. doi: 10.1093/cvr/cvr069. Epub 2011 Mar 8. PMID: 21385837.

Miyamoto M, Gangrade H, Tampakakis E. Understanding Heart Field Progenitor Cells for Modeling Congenital Heart Diseases. Curr Cardiol Rep. 2021 Mar 11;23(5):38. doi: 10.1007/s11886-021-01468-5. PMID: 33694131.

Miyamoto M, Kannan S, Anderson MJ, Liu X, Suh D, Htet M, Li B, Kakani T, Murphy S, Tampakakis E, Lewandoski M, Andersen P, Uosaki H, Kwon C. Cardiac progenitors instruct second heart field fate through Wnts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Jan 24;120(4):e2217687120. doi: 10.1073/pnas.2217687120. Epub 2023 Jan 17. PMID: 36649430; PMCID: PMC9942880.

Mizera J, Kazek G, Pomierny B, Bystrowska B, Niedzielska-Andres E, Pomierny-Chamiolo L. Maternal High-Fat diet During Pregnancy and Lactation Disrupts NMDA Receptor Expression and Spatial Memory in the Offspring. Mol Neurobiol. 2022 Sep;59(9):5695-5721. doi: 10.1007/s12035-022-02908-1. Epub 2022 Jul 1. PMID: 35773600.

Mjaatvedt, C. H., T. Nakaoka, et al. (2001). "The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field." Dev Biol 238(1): 97-109.

Moon, A., 2008. Chapter 4 Mouse Models of Congenital Cardiovascular Disease, in: Current Topics in Developmental Biology. Elsevier, pp. 171–248. https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00604-2.

Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, Sun Y, Evans SM, Laugwitz KL, Chien KR. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. Cell. 2006 Dec 15;127(6):1151-65. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.029. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17123592.

Morgenthau A, Frishman WH. Genetic Origins of Tetralogy of Fallot. Cardiol Rev. 2018 Mar/Apr;26(2):86-92. doi: 10.1097/CRD.0000000000000170. PMID: 29045289.

Motojima K. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR): structure, mechanisms of activation and diverse functions. Cell Struct Funct. 1993 Oct;18(5):267-77. doi: 10.1247/csf.18.267. PMID: 8168153.

Mouton AJ, Li X, Hall ME, Hall JE. Obesity, Hypertension, and Cardiac Dysfunction: Novel Roles of Immunometabolism in Macrophage Activation and Inflammation. Circ Res. 2020

Mar 13;126(6):789-806. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.312321. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32163341; PMCID: PMC7255054.

Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, et al. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/betacatenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(52):19812–7. https://doi.org/10.1073/pnas.0605768103.

Nakamura M, Sadoshima J. Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes. J Physiol. 2020 Jul;598(14):2977-2993. doi: 10.1113/JP276747. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30869158.

Nedergaard J, Petrovic N, Lindgren EM, Jacobsson A, Cannon B. PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. Biochim Biophys Acta. 2005 May 30;1740(2):293-304. doi: 10.1016/j.bbadis.2005.02.003. Epub 2005 Feb 22. PMID: 15949696.

Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. N Engl J Med. 2007 Mar 15;356(11):1140-51. doi: 10.1056/NEJMra063052. PMID: 17360992.

Oikonomou EK, Antoniades C. The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. Nat Rev Cardiol. 2019 Feb;16(2):83-99. doi: 10.1038/s41569-018-0097-6. PMID: 30287946.

Osyczka A, Moser CC, Dutton PL (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* 30: 176–182

Ozanne SE, Nave BT, Wang CL, Shepherd PR, Prins J, Smith GD. Poor fetal nutrition causes long-term changes in expression of insulin signaling components in adipocytes. Am J Physiol. 1997 Jul;273(1 Pt 1):E46-51. doi: 10.1152/ajpendo.1997.273.1.E46. PMID: 9252478.

Page DJ, Miossec MJ, Williams SG, Monaghan RM, Fotiou E, Cordell HJ, Sutcliffe L, Topf A, Bourgey M, Bourque G, Eveleigh R, Dunwoodie SL, Winlaw DS, Bhattacharya S, Breckpot J, Devriendt K, Gewillig M, Brook JD, Setchfield KJ, Bu'Lock FA, O'Sullivan J, Stuart G, Bezzina CR, Mulder BJM, Postma AV, Bentham JR, Baron M, Bhaskar SS, Black GC, Newman WG, Hentges KE, Lathrop GM, Santibanez-Koref M, Keavney BD. Whole Exome Sequencing Reveals the Major Genetic Contributors to Nonsyndromic Tetralogy of Fallot. Circ Res. 2019 Feb 15;124(4):553-563. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313250. PMID: 30582441; PMCID: PMC6377791.

Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK. A

mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. Cell. 2008 Jul 11;134(1):112-23. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.016. PMID: 18614015; PMCID: PMC2778844.

Pan J, Baker KM. Retinoic acid and the heart. Vitam Horm. 2007;75:257-83. doi: 10.1016/S0083-6729(06)75010-5. PMID: 17368319.

Pane LS, Zhang Z, Ferrentino R, Huynh T, Cutillo L, Baldini A. Tbx1 is a negative modulator of Mef2c. Hum Mol Genet. 2012 Jun 1;21(11):2485-96. doi: 10.1093/hmg/dds063. Epub 2012 Feb 24. PMID: 22367967; PMCID: PMC3349424

Paré JF, Malenfant D, Courtemanche C, Jacob-Wagner M, Roy S, Allard D, Bélanger L. The fetoprotein transcription factor (FTF) gene is essential to embryogenesis and cholesterol homeostasis and is regulated by a DR4 element. J Biol Chem. 2004 May 14;279(20):21206-16. doi: 10.1074/jbc.M401523200. Epub 2004 Mar 10. PMID: 15014077.

Park EJ, Watanabe Y, Smyth G, Miyagawa-Tomita S, Meyers E, Klingensmith J, et al. An FGF autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart. Development. 2008;135(21):3599–610. https://doi.org/10.1242/dev.025437.

Paulson DJ, Ward KM, Shug AL. Malonyl CoA inhibition of carnitine palmityltransferase in rat heart mitochondria. FEBS Lett. 1984 Oct 29;176(2):381-4. doi: 10.1016/0014-5793(84)81201-6. PMID: 6489524.

Perry, C. G. R., Kane, D. A., Herbst, E. A. F., Mukai, K., Lark, D. S., Wright, D. C., … Holloway, G. P. (2012). Mitochondrial creatine kinase activity and phosphate shuttling are acutely regulated by exercise in human skeletal muscle. The Journal of Physiology, 590(Pt 21), 5475–5486. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.234682

Person, A.D., Klewer, S.E., Runyan, R.B., 2005. Cell biology of cardiac cushion development. Int Rev Cytol 243, 287-335.

Persson M, Cnattingius S, Villamor E, Söderling J, Pasternak B, Stephansson O, Neovius M. Risk of major congenital malformations in relation to maternal overweight and obesity severity: cohort study of 1.2 million singletons. BMJ. 2017 Jun 14;357:j2563. doi: 10.1136/bmj.j2563. PMID: 28615173; PMCID: PMC5470075.

Persson M, Razaz N, Edstedt Bonamy AK, Villamor E, Cnattingius S. Maternal Overweight and Obesity and Risk of Congenital Heart Defects. J Am Coll Cardiol. 2019 Jan 8;73(1):44-53. doi: 10.1016/j.jacc.2018.10.050. PMID: 30621950.

Picard F, Auwerx J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. Annu Rev Nutr. 2002;22:167-97. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.010402.102808. Epub 2002 Jan 4. PMID: 12055342.

Pierpont M.E., Brueckner M., Chung W.K., Garg V., Lacro R.V., McGuire A.L., Mital S., Priest J.R., Pu W.T., Roberts A., et al. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2018;138:653–711. doi: 10.1161/CIR.0000000000000606.

Pohjoismäki JL, Goffart S. The role of mitochondria in cardiac development and protection. Free Radic Biol Med. 2017 May;106:345-354. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.032. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28216385.

Porter GA Jr, Hom J, Hoffman D, Quintanilla R, de Mesy Bentley K, Sheu SS. Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation. Prog Pediatr Cardiol. 2011 May;31(2):75-81. doi: 10.1016/j.ppedcard.2011.02.002. PMID: 21603067; PMCID: PMC3096664.

Poston L. Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long term health. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2012 Oct;26(5):627-39. doi: 10.1016/j.beem.2012.03.010. Epub 2012 Apr 30. PMID: 22980045.

Priya, R., Allanki, S., Gentile, A., Mansingh, S., Uribe, V., Maischein, H.-M. et al (2020) Tension heterogeneity directs form and fate to pattern the myocardial wall. Nature 588, 130–134 https://doi.org/10.1038/s41586-020-2946-9.

Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev. 2003 Feb;24(1):78-90. doi: 10.1210/er.2002-0012. PMID: 12588810.

Quiles JM, Gustafsson ÅB. The role of mitochondrial fission in cardiovascular health and disease. Nat Rev Cardiol. 2022 Nov;19(11):723-736. doi: 10.1038/s41569-022-00703-y. Epub 2022 May 6. PMID: 35523864; PMCID: PMC10584015.

Qyang Y, Martin-Puig S, Chiravuri M, Chen S, Xu H, Bu L, Jiang X, Lin L, Granger A, Moretti A, Caron L, Wu X, Clarke J, Taketo MM, Laugwitz KL, Moon RT, Gruber P, Evans SM, Ding S, Chien KR. The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. Cell Stem Cell. 2007 Aug 16;1(2):165-79. doi: 10.1016/j.stem.2007.05.018. Epub 2007 Jun 14. PMID: 18371348.

Rammah M, Théveniau-Ruissy M, Sturny R, Rochais F, Kelly RG. PPARγ and NOTCH Regulate Regional Identity in the Murine Cardiac Outflow Tract. Circ Res. 2022 Oct

28;131(10):842-858. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.320766. Epub 2022 Oct 7. PMID: 36205127.

Rana MS, Théveniau-Ruissy M, De Bono C, Mesbah K, Francou A, Rammah M, Domínguez JN, Roux M, Laforest B, Anderson RH, et al. Tbx1 coordinates addition of posterior second heart field progenitor cells to the arterial and venous poles of the heart. *Circ Res*. 2014;115:790–799. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.305020

Riley PR. An epicardial floor plan for building and rebuilding the mammalian heart. Curr Top Dev Biol. 2012;100:233-51. doi: 10.1016/B978-0-12-387786-4.00007-5. PMID: 22449846.

Rim EY, Clevers H, Nusse R. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. Annu Rev Biochem. 2022 Jun 21;91:571-598. doi: 10.1146/annurev-biochem-040320-103615. Epub 2022 Mar 18. PMID: 35303793.

Rochais, F., Mesbah, K., Kelly, R.G., 2009. Signaling Pathways Controlling Second Heart Field Development. Circ. Res. 104, 933–942.

Rogue A, Spire C, Brun M, Claude N, Guillouzo A. Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. PPAR Res. 2010;2010:325183. doi: 10.1155/2010/325183. Epub 2010 Oct 19. PMID: 20981297; PMCID: PMC2963138

Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. Science. 2007 Jul 20;317(5836):372-6. doi: 10.1126/science.1139740. PMID: 17641202.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. Mol Cell. 1999 Oct;4(4):611-7. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80211-7. PMID: 10549292.

Rothfield, L. I. (2014). Structure and Function of Biological Membranes. Academic Press.

Rowton M; C. Perez-Cervantes; S. Hur; J. Jacobs-Li; E. Lu; N. Deng; A. Guzzetta; A. D. Hoffmann; M. Stocker; J. D. Steimle; S. Lazarevic; S. Oubaha; X. H. Yang; C. Kim; S. Yu; H. Eckart; M. Koska; E. Hanson; S. S. K. Chan; D. J. Garry; M. Kyba; A. Basu; K. Ikegami; S. Pott; I. P. Moskowitz Hedgehog signaling activates a mammalian heterochronic gene regulatory network controlling differentiation timing across lineages*, Dev. Cell*, Volume 57 (2022), pp. 2181-2203

Russell LK, Mansfield CM, Lehman JJ, Kovacs A, Courtois M, Saffitz JE, Medeiros DM, Valencik ML, McDonald JA, Kelly DP. Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. Circ Res. 2004 Mar 5;94(4):525-33. doi: 10.1161/01.RES.0000117088.36577.EB. Epub 2004 Jan 15. PMID: 14726475.

Ryckebusch L, Wang Z, Bertrand N, Lin S-C, Chi X, Schwartz R, Zaffran S, Niederreither K. 2008 Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. Proc. Natl Acad. Sci. USA 105, 2913–2918. (doi:10. 1073/pnas.0712344105

Saddik M, Lopaschuk GD. Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. J Biol Chem. 1991 May 5;266(13):8162-70. PMID: 1902472.

Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. Mesp1 expression is the earliest sign of cardiovascular development. Trends Cardiovasc Med. 2000 Nov;10(8):345-52. doi: 10.1016/s1050-1738(01)00069-x. PMID: 11369261.

Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi A, Kitajima S, Miyazaki Ji, Inoue T. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. Development. 1999 Aug;126(15):3437-47. doi: 10.1242/dev.126.15.3437. PMID: 10393122.

Saks, V., Kaambre, T., Guzun, R., Anmann, T., Sikk, P., Schlattner, U., … Vendelin, M. (2007). The creatine kinase phosphotransfer network: thermodynamic and kinetic considerations, the impact of the mitochondrial outer membrane and modelling approaches. Sub-Cellular Biochemistry, 46, 27–65

Satin J, Fujii S, DeHaan RL. Development of cardiac beat rate in early chick embryos is regulated by regional cues. Dev Biol. 1988 Sep;129(1):103-13. doi: 10.1016/0012-1606(88)90165-0. PMID: 3410155.

Schachtrup C, Emmler T, Bleck B, Sandqvist A, Spener F. Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins. Biochem J. 2004 Aug 15;382(Pt 1):239-45. doi: 10.1042/BJ20031340. PMID: 15130092; PMCID: PMC1133936.

Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. EMBO J. 1996 Oct 1;15(19):5336-48. PMID: 8895578; PMCID: PMC452277.

Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. Genes Dev. 1997 Feb 15;11(4):451-62. doi: 10.1101/gad.11.4.451. PMID: 9042859.

Shao D, Kolwicz SC Jr, Wang P, Roe ND, Villet O, Nishi K, Hsu YA, Flint GV, Caudal A, Wang W, Regnier M, Tian R. Increasing Fatty Acid Oxidation Prevents High-Fat Diet-Induced Cardiomyopathy Through Regulating Parkin-Mediated Mitophagy. Circulation. 2020 Sep 8;142(10):983-997. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043319. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32597196; PMCID: PMC7484440.

Sharma S, Adrogue JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, Noon GP, Frazier OH, Taegtmeyer H. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. FASEB J. 2004 Nov;18(14):1692-700. doi: 10.1096/fj.04-2263com. PMID: 15522914.

Shenje LT, Andersen P, Uosaki H, Fernandez L, Rainer PP, Cho GS, Lee DI, Zhong W, Harvey RP, Kass DA, Kwon C. Precardiac deletion of numb and numblike reveals renewal of cardiac progenitors. *Elife*. 2014;3:e02164

Shinebourne EA, Babu-Narayan SV, Carvalho JS. Tetralogy of Fallot: from fetus to adult. Heart. 2006 Sep;92(9):1353-9. doi: 10.1136/hrt.2005.061143. PMID: 16908723; PMCID: PMC1861206.

Sinha T, Li D, Théveniau-Ruissy M, Hutson MR, Kelly RG, Wang J. Loss of Wnt5a disrupts second heart field cell deployment and may contribute to OFT malformations in DiGeorge syndrome. Hum Mol Genet. 2015 Mar 15;24(6):1704-16. doi: 10.1093/hmg/ddu584. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25410658; PMCID: PMC4381755.

Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA, Townsend PA, Torrens C, Hoile SP, Hanson MA, Burdge GC. Feeding a protein-restricted diet during pregnancy induces altered epigenetic regulation of peroxisomal proliferator-activated receptor-α in the heart of the offspring. J Dev Orig Health Dis. 2011 Aug;2(4):250-5. doi: 10.1017/S2040174410000425. PMID: 22003431; PMCID: PMC3191520.

Soufan AT, Ruijter JM, van den Hoff MJ, de Boer PA, Hagoort J, Moorman AF. Three-dimensional reconstruction of gene expression patterns during cardiac development. Physiol Genomics. 2003 May 13;13(3):187-95. doi: 10.1152/physiolgenomics.00182.2002. Epub 2003 May 13. PMID: 12746463.

Soufan, A.T., et al., Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation. Circ Res, 2006. 99(5): p. 545-52.

Stefanovic S, Etchevers HC, Zaffran S. Outflow Tract Formation-Embryonic Origins of Conotruncal Congenital Heart Disease. J Cardiovasc Dev Dis. 2021 Apr 9;8(4):42. doi: 10.3390/jcdd8040042. PMID: 33918884; PMCID: PMC8069607.

Stefanovic S, Laforest B, Desvignes JP, Lescroart F, Argiro L, Maurel-Zaffran C, Salgado D, Plaindoux E, De Bono C, Pazur K, Théveniau-Ruissy M, Béroud C, Puceat M, Gavalas A, Kelly RG, Zaffran S. *Hox*-dependent coordination of mouse cardiac progenitor cell patterning and differentiation. Elife. 2020 Aug 17;9:e55124. doi: 10.7554/eLife.55124. PMID: 32804075; PMCID: PMC7462617.

Steimle J. D; S. A. Rankin; C. E. Slagle; J. Bekeny; A. B. Rydeen; S. S. Chan; J. Kweon; X. H. Yang; K. Ikegami; R. D. Nadadur; M. Rowton; A. D. Hoffmann; S. Lazarevic; W. Thomas; E. A. T. Boyle Anderson; M. E. Horb; L. Luna-Zurita; R. K. Ho; M. Kyba; B. Jensen; A. M. Zorn; F. L. Conlon; I. P. Moskowitz Evolutionarily conserved Tbx5-Wnt2/2b pathway orchestrates cardiopulmonary development*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Volume 115 (2018), p. E10615-E10624

Stephan K, Ott M (2020) Timing of dimerization of the bc1 complex during mitochondrial respiratory chain assembly. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1861: 148177

Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. JAMA. 2009 Feb 11;301(6):636-50. doi: 10.1001/jama.2009.113. PMID: 19211471.

Sucov HM, Gu Y, Thomas S, Li P, Pashmforoush M. Epicardial control of myocardial proliferation and morphogenesis. Pediatr Cardiol. 2009 Jul;30(5):617-25. doi: 10.1007/s00246-009-9391-8. Epub 2009 Mar 10. PMID: 19277768.

Sun J, Chen X, Chen H, Ma Z, Zhou J. Maternal Alcohol Consumption before and during Pregnancy and the Risks of Congenital Heart Defects in Offspring: A Systematic Review and Meta-analysis. Congenit Heart Dis. 2015 Sep-Oct;10(5):E216-24. doi: 10.1111/chd.12271. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26032942.

Szczawińska-Popłonyk A, Schwartzmann E, Chmara Z, Głukowska A, Krysa T, Majchrzycki M, Olejnicki M, Ostrowska P, Babik J. Chromosome 22q11.2 Deletion Syndrome: A Comprehensive Review of Molecular Genetics in the Context of Multidisciplinary Clinical Approach. Int J Mol Sci. 2023 May 5;24(9):8317. doi: 10.3390/ijms24098317. PMID: 37176024; PMCID: PMC10179617.

Théveniau-Ruissy M, Dandonneau M, Mesbah K, Ghez O, Mattei MG, Miquerol L, Kelly RG (2008) The del22q11.2 candidate gene Tbx1 controls regional outflow tract identity and coronary artery patterning. Circ Res 103(2):142–148.

Théveniau-Ruissy M, Pérez-Pomares JM, Parisot P, Baldini A, Miquerol L, Kelly RG. Coronary stem development in wild-type and Tbx1 null mouse hearts. Dev Dyn. 2016 Apr;245(4):445-59. doi: 10.1002/dvdy.24380. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26708418.

Timohhina, N., Guzun, R., Tepp, K., Monge, C., Varikmaa, M., Vija, H., … Saks, V. (2009). Direct measurement of energy fluxes from mitochondria into cytoplasm in permeabilized cardiac cells in situ: some evidence for Mitochondrial Interactosome. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 41(3), 259–275. https://doi.org/10.1007/s10863-009-9224-8

Trimm E, Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. Nat Rev Cardiol. 2023 Mar;20(3):197-210. doi: 10.1038/s41569-022-00770-1. Epub 2022 Oct 5. PMID: 36198871; PMCID: PMC9533272.

Tsushima K, Bugger H, Wende AR, Soto J, Jenson GA, Tor AR, McGlauflin R, Kenny HC, Zhang Y, Souvenir R, Hu XX, Sloan CL, Pereira RO, Lira VA, Spitzer KW, Sharp TL, Shoghi KI, Sparagna GC, Rog-Zielinska EA, Kohl P, Khalimonchuk O, Schaffer JE, Abel ED. Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Lipotoxic Hearts Induce Post-Translational Modifications of AKAP121, DRP1, and OPA1 That Promote Mitochondrial Fission. Circ Res. 2018 Jan 5;122(1):58-73. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311307. Epub 2017 Nov 1. PMID: 29092894; PMCID: PMC5756120.

Turunen R, Pulakka A, Metsälä J, Vahlberg T, Ojala T, Gissler M, Kajantie E, Helle E. Maternal Diabetes and Overweight and Congenital Heart Defects in Offspring. JAMA Netw Open. 2024 Jan 2;7(1):e2350579. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.50579. PMID: 38180757; PMCID: PMC10770771.

Tzahor E, Lassar AB. Wnt signals from the neural tube block ectopic cardiogenesis. Genes Dev. 2001 Feb 1;15(3):255-60. doi: 10.1101/gad.871501. PMID: 11159906; PMCID: PMC312627.

Ufer C, Wang CC. The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. Front Mol Neurosci. 2011 Jul 28;4:12. doi: 10.3389/fnmol.2011.00012. PMID: 21847368; PMCID: PMC3148772.

Urness LD, Bleyl SB, Wright TJ, Moon AM, Mansour SL. Redundant and dosage sensitive requirements for Fgf3 and Fgf10 in cardiovascular development. Dev Biol. 2011;356(2): 383–97. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.671.

Vaillant F, Lauzier B, Poirier I, Gélinas R, Rivard ME, Robillard Frayne I, Thorin E, Des Rosiers C. Mouse strain differences in metabolic fluxes and function of ex vivo working hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014 Jan 1;306(1):H78-87. doi: 10.1152/ajpheart.00465.2013. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24186097.

Van Belle TL, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D and diabetes: the odd couple. Trends Endocrinol Metab. 2013 Nov;24(11):561-8. doi: 10.1016/j.tem.2013.07.002. Epub 2013 Aug 21. PMID: 23972673.

van den Berg, G., et al., A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube. Circ Res, 2009. 104(2): p. 179-88

Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. Cardiovasc Res. 2008 Jul 15;79(2):208-17. doi: 10.1093/cvr/cvn098. Epub 2008 Apr 22. PMID: 18430751.

Vignes, H., Vagena-Pantoula, C., Prakash, M., Fukui, H., Norden, C., Mochizuki, N. et al (2022) Extracellular mechanical forces drive endocardial cell volume decrease during zebrafish cardiac valve morphogenesis. Dev. Cell 57, 598–609.e5 https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.011.

Vincentz JW, Casasnovas JJ, Barnes RM, Que J, Clouthier DE, Wang J, Firulli AB. Exclusion of Dlx5/6 expression from the distal-most mandibular arches enables BMP-mediated specification of the distal cap. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jul 5;113(27):7563-8. doi: 10.1073/pnas.1603930113. Epub 2016 Jun 22. PMID: 27335460; PMCID: PMC4941460.

Vincentz JW, Firulli BA, Toolan KP, Osterwalder M, Pennacchio LA, Firulli AB. HAND transcription factors cooperatively specify the aorta and pulmonary trunk. Dev Biol. 2021 Aug;476:1-10. doi: 10.1016/j.ydbio.2021.03.011. Epub 2021 Mar 20. PMID: 33757801; PMCID: PMC8172455.

Virágh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. Anat Rec. 1981 Sep;201(1):157-68. doi: 10.1002/ar.1092010117. PMID: 7305017.

Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation. Exp Biol Med (Maywood). 2007 Jul;232(7):852-65. PMID: 17609501.

Waldo, K. L., D. H. Kumiski, et al. (2001). "Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field." Development 128(16): 3179-88.

Waldo, K.L., Hutson, M.R., Stadt, H.A., Zdanowicz, M., Zdanowicz, J., Kirby, M.L., 2005a. Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field. Developmental biology 281, 66-77.

Waldo, K.L., Hutson, M.R., Ward, C.C., Zdanowicz, M., Stadt, H.A., Kumiski, D., Abu-Issa, R., Kirby, M.L., 2005b. Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart. Dev Biol 281, 78-90.

Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. Annu Rev Genet. 2009;43:95-118. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134850. PMID: 19659442; PMCID: PMC4762029.

Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, Ye J, Yan Z, Denduluri S, Idowu O, Li M, Shen C, Hu A, Haydon RC, Kang R, Mok J, Lee MJ, Luu HL, Shi LL. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. Genes Dis. 2014 Sep;1(1):87-105. doi: 10.1016/j.gendis.2014.07.005. PMID: 25401122; PMCID: PMC4232216.

Wang X, Astrof S. Neural crest cell-autonomous roles of fibronectin in cardiovascular development. Development. 2016 Jan 1;143(1):88-100. doi: 10.1242/dev.125286. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26552887; PMCID: PMC4725203.

Wang, H. et al. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. J. Lipid Res. 52, 2159–2168 (2011).

Wang, P., Liu, J., Li, Y., Wu, S., Luo, J., Yang, H., Subbiah, R., Chatham, J., Zhelyabovska, O., & Yang, Q. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor is an essential transcriptional regulator for mitochondrial protection and biogenesis in adult heart. Circulation Research, 106(5), 911919. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.20618

Watanabe M, Choudhry A, Berlan M, Singal A, Siwik E, Mohr S, Fisher SA. Developmental remodeling and shortening of the cardiac outflow tract involves myocyte programmed cell death. Development. 1998 Oct;125(19):3809-20. doi: 10.1242/dev.125.19.3809. PMID: 9729489.

Watanabe M, Jafri A, Fisher SA. Apoptosis is required for the proper formation of the ventriculo-arterial connections. Dev Biol. 2001 Dec 1;240(1):274-88. doi: 10.1006/dbio.2001.0466. PMID: 11784063.

Watanabe Y, Miyagawa-Tomita S, Vincent SD, Kelly RG, Moon AM, Buckingham ME. Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries. Circ Res. 2010 Feb 19;106(3):495-503. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201665. Epub 2009 Dec 24. PMID: 20035084; PMCID: PMC2843098.

Watanabe Y, Zaffran S, Kuroiwa A, Higuchi H, Ogura T, Harvey RP, Kelly RG, Buckingham M (2012) Fibroblast growth factor 10 gene regulation in the second heart

field by Tbx1, Nkx2-5, and Islet1 reveals a genetic switch for down-regulation in the myocardium. Proc Natl Acad Sci USA 109(45):18273–18280

Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. Endocrinology. 2001 Mar;142(3):1269-77. doi: 10.1210/endo.142.3.8037. PMID: 11181544.

Wessels, A. and D. Sedmera (2003). "Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man." Physiol Genomics 15(3): 165-76.

Wikstrom MKF (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria. *Nature* 266: 271–273

Williams K, Carson J, Lo C. Génétique des cardiopathies congénitales. Biomolécules. 16 décembre 2019 ; 9(12):879. DOI : 10.3390/BIOM9120879. PMID : 31888141 ; PMCID : PMC6995556.

Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA, Gertz EW. Effects of acute hyperglycemia on myocardial glycolytic activity in humans. J Clin Invest. 1990 May;85(5):1648-56. doi: 10.1172/JCI114616. PMID: 2185277; PMCID: PMC296617.

Wood, J. G.; Rogina, B.; Lavu, S.; Howitz, K.; Helfand, S. L.; Tatar, M.; Sinclair, D., Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* **2004,** 430, (7000), 686-9.

Wu, Mingfu and Li, Jingjing. "Numb family proteins: novel players in cardiac morphogenesis and cardiac progenitor cell differentiation" *Biomolecular Concepts*, vol. 6, no. 2, 2015, pp. 137-148. https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0003

Xie Y, Su N, Yang J, Tan Q, Huang S, Jin M, Ni Z, Zhang B, Zhang D, Luo F, Chen H, Sun X, Feng JQ, Qi H, Chen L. FGF/FGFR signaling in health and disease. Signal Transduct Target Ther. 2020 Sep 2;5(1):181. doi: 10.1038/s41392-020-00222-7. PMID: 32879300; PMCID: PMC7468161.

Yamagishi H. Cardiac Neural Crest. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2021 Jan 4;13(1):a036715. doi: 10.1101/cshperspect.a036715. PMID: 32071091; PMCID: PMC7778148.

Yamaguchi Y, Cavallero S, Patterson M, Shen H, Xu J, Kumar SR, Sucov HM. Adipogenesis and epicardial adipose tissue: a novel fate of the epicardium induced by mesenchymal transformation and PPARγ activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 17;112(7):2070-

5. doi: 10.1073/pnas.1417232112. Epub 2015 Feb 2. PMID: 25646471; PMCID: PMC4343131.

Ye B, Hou N, Xiao L, Xu Y, Boyer J, Xu H, Li F. APC controls asymmetric Wnt/β-catenin signaling and cardiomyocyte proliferation gradient in the heart. J Mol Cell Cardiol. 2015 Dec;89(Pt B):287-96. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.018. Epub 2015 Oct 19. PMID: 26493106; PMCID: PMC4801005.

Ye Z, Wang L, Yang T, Chen L, Wang T, Chen L, Zhao L, Zhang S, Zheng Z, Luo L, Qin J. Infection virale maternelle et risque de cardiopathies congénitales fœtales : une méta-analyse d'études observationnelles. J Am Heart Assoc. 7 mai 2019 ; 8(9) :E011264. doi : 10.1161/JAHA.118.011264. PMID : 30995883 ; PMCID : PMC6512143.

Yu F, Abdelwahid E, Xu T, Hu L, Wang M, Li Y, Mogharbel BF, de Carvalho KAT, Guarita-Souza LC, An Y, Li P. The role of mitochondrial fusion and fission in the process of cardiac oxidative stress. Histol Histopathol. 2020 Jun;35(6):541-552. doi: 10.14670/HH-18-191. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31820815.

Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. Circ Res. 2004 Aug 6;95(3):261-8. doi: 10.1161/01.RES.0000136815.73623.BE Epub 2004 Jun 24. PMID: 15217909.

Zaidi S., Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circ. Res.* 2017;120:923–940. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309140.

Zhang T, Guan H, Arany E, Hill DJ, Yang K. Maternal protein restriction permanently programs adipocyte growth and development in adult male rat offspring. J Cell Biochem. 2007 May 15;101(2):381-8. doi: 10.1002/jcb.21176. PMID: 17230459.

Zhao Q, Sun Q, Zhou L, Liu K, Jiao K. Régulation complexe de la fonction mitochondriale au cours du développement cardiaque. J Am Heart Assoc. 2019 juil. 2 ; 8(13) :E012731. doi : 10.1161/JAHA.119.012731. EPUB 19 juin 2019. PMID : 31215339 ; PMCID : PMC6662350.

Zhao Y, Tan H, Zhang X, Zhu J. Roles of peroxisome proliferator-activated receptors in hepatocellular carcinoma. J Cell Mol Med. 2023 Nov 20;28(5):e18042. doi: 10.1111/jcmm.18042. Epub ahead of print. PMID: 37987033; PMCID: PMC10902579.

Zheng M, Erhardt S, Ai D, Wang J. Bmp Signaling Regulates Hand1 in a Dose-Dependent Manner during Heart Development. Int J Mol Sci. 2021 Sep 11;22(18):9835. doi: 10.3390/ijms22189835. PMID: 34576009; PMCID: PMC8465227.

Zhou S, Wang Q, Meng Z, Peng J, Zhou Y, Song W, et al. Mutations in fibroblast growth factor (FGF8) and FGF10 identified in patients with conotruncal defects. J Transl Med. 2020;18(1):283. https://doi.org/10.1186/s12967-020-02445-2

Zhu MJ, Ma XY, Ding PC, Tang HF, Peng R, Lu L, et al. Novel mutations of AXIN2 identified in a Chinese Congenital Heart Disease Cohort. J Hum Genet. 2019;64(5):427–35. https://doi. org/10.1038/s10038-019-0572-x

Zolezzi JM, Silva-Alvarez C, Ordenes D, Godoy JA, Carvajal FJ, Santos MJ, Inestrosa NC. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and PPARα agonists modulate mitochondrial fusion-fission dynamics: relevance to reactive oxygen species (ROS)-related neurodegenerative disorders? PLoS One. 2013 May 13;8(5):e64019. doi: 10.1371/journal.pone.0064019. PMID: 23675519; PMCID: PMC3652852.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol Rev. 2014 Jul;94(3):909-50. doi: 10.1152/physrev.00026.2013. PMID: 24987008; PMCID: PMC4101632.