

Université de Montréal

**Exercice et protection myocardique chez des rats génétiquement
diabétiques ou hypertendus.**

Par

Claude Lajoie, M.Sc.

Département de kinésiologie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en sciences de l'activité physique option physiologie de
l'exercice

Février, 2004

© Claude Lajoie, 2004



GV
201
U54
2004
v.004

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Exercice et protection myocardique chez des rats génétiquement
diabétiques ou hypertendus.**

Présenté par :

Claude Lajoie M.Sc.

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Claude Alain
Président-rapporteur

Louise Béliveau
Directrice de recherche

François Trudeau
Codirecteur

Yan Burelle
Membre du jury

André Marette
Examineur externe

Christian Deschepper
Représentant du doyen de la FES

Sommaire

L'objectif de cette thèse était d'améliorer nos connaissances sur la voie signalétique de la protéine kinase B (PKB) et de la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) et le statut de plusieurs molécules importantes liées à la survie cellulaire dans des myocardiocytes d'organismes résistants à l'insuline et hypertendus. Cette thèse comporte trois études distinctes décrivant la régulation de l'axe signalétique de la PKB et de la GSK-3 dans le cœur d'animaux génétiquement diabétiques de *type 2* (rats ZDF) ou hypertendus (rats SHR) avec des caractéristiques de ces pathologies similaires à celles observées chez l'humain. Nous avons observé que la régulation de la voie PKB/GSK-3 était altérée dans le myocarde des rats ZDF. Parce que l'exercice contribue à améliorer l'action de l'insuline et les anomalies cardiovasculaires du cœur diabétique ou hypertendu, une série d'expériences ont été entreprises pour vérifier les effets de l'entraînement sur la régulation de la voie PKB/GSK-3 et sur Bcl-2, Bax et HSP-72 dans le myocarde de rat SHR et ZDF.

Dans la première étude, nous avons démontré que la phosphorylation de PKB était altérée chez les animaux qui développent une hyperglycémie rapide, plutôt qu'une hyperglycémie tardive. La phosphorylation du résidu PKB Thr³⁰⁸ et de la GSK-3 α/β était significativement augmentée, et ce, en concomitance avec une déphosphorylation du résidu PKB Ser⁴⁷³. L'induction rapide du diabète de *type 2* pourrait affecter les mécanismes de protection cellulaire, puisque le ratio Bcl-2/Bax était réduit. Un délai dans l'initiation de l'hyperglycémie pourrait protéger contre les effets néfastes de l'apoptose en maintenant un ratio Bcl-2/Bax normal par un

mécanisme qui augmente l'expression de la protéine Bcl-2 dans le cœur des rats ZDF. De plus, nous avons observé que le poids du cœur des rats ZDF n'a pas augmenté en parallèle avec le poids du corps malgré l'hyperinsulinémie et la phosphorylation marquée de PKB Thr³⁰⁸ et de GSK-3 dans le cœur des rats ZDF.

Dans la deuxième étude, nous avons démontré que la phosphorylation de PKB et de GSK-3 était altérée dans le myocarde des rats ZDF sévèrement atteints du diabète. Nous avons aussi démontré que l'exercice chronique améliore la phosphorylation des résidus Ser⁴⁷³ et Thr³⁰⁸ de PKB et a normalisé la phosphorylation de GSK-3 dans le myocarde des rats ZDF. Ces résultats suggèrent que la réduction de la glycémie et du contenu en glycogène, en concomitance à l'augmentation de l'insulinémie, ont pu améliorer l'état de phosphorylation de PKB.

L'apoptose a été identifiée dans le modèle de rat SHR comme étant un modulateur critique du remodelage cardiaque. L'étude suivante a étudié les effets potentiellement protecteurs de l'entraînement physique lorsque la pression sanguine commence à augmenter abruptement, vers l'âge de 4 semaines, chez ces animaux. La phosphorylation de PKB était beaucoup améliorée et ceci était associé à une modeste élévation de la phosphorylation de GSK-3 β Ser⁹ chez le rat SHR exercé. L'expression de la protéine Bax était augmentée dans le cœur des rats SHR exercés et ce, en concomitance avec une augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2, ce qui aurait favorisé le maintien du ratio Bcl-2/bax dans le myocarde des rats SHR exercés.

En général, les résultats des études présentées dans cette thèse pourront contribuer à la compréhension des effets de l'entraînement physique sur la régulation des protéines liées à la protection cellulaire du myocarde diabétique ou hypertendu. Ces résultats démontrent que l'entraînement physique affecte la signalisation intracellulaire de la voie PKB/GSK-3 et l'expression de certaines molécules anti-apoptotique (Bcl-2, HSP-72) et pro-apoptotique (Bax) dans le myocarde de rats résistant à l'insuline.

Mots-Clés

Apoptose

Ratio Bcl-2/Bax

Survie cellulaire

Diabète

Glycogène Synthase Kinase-3 (GSK-3)

Protéine de stress-72 (HSP-72)

Cœur

Hypertension

Insuline

Protéine Kinase B (PKB)

Summary

The purpose of this work was to broaden our limited understanding of the regulation of the protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 (PKB/GSK-3) pathway and the status of several important molecules related to cell survival in the insulin-resistant myocardium *in vivo*. In order to investigate this, we chose two insulin-resistant animal models, the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat and the spontaneously hypertensive rat (SHR) which genetically manifest numerous characteristics of insulin resistance similar to those observed in humans. We observed that the regulation of PKB/GSK-3 was altered in the myocardium of the ZDF rat. Because exercise training has been shown to improve the action of insulin and diabetic- and hypertension-mediated cardiovascular abnormalities, a series of experiments were performed to verify the effect of exercise training on the regulation of the PKB/GSK-3 pathway and Bcl-2, Bax and HSP-72 protein expression in the myocardium of SHR and ZDF rats.

In the first study, we found that in ZDF animals with a rapid, rather than a more delayed onset of hyperglycemia, a strong PKB Thr³⁰⁸ and GSK-3 α/β phosphorylation along with a reduced PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation and a pro-apoptotic state were present. A more delayed onset may have protected against apoptosis by maintaining a normal Bcl-2/Bax ratio by a mechanism that increased the protein expression of Bcl-2 in the ZDF heart. Moreover, we observed that the heart did not grow in parallel with the body in spite of elevated plasma insulin content and high PKB Thr³⁰⁸ and GSK-3 phosphorylation in the ZDF heart.

In the second study, we demonstrated a decreased phosphorylation of PKB and GSK-3 in the myocardium of the ZDF rat with severe diabetes. Training improved phosphorylation of both PKB residues and partially normalized GSK-3 phosphorylation in the myocardium of the ZDF rat. These findings suggest that the reduced glycemia and heart glycogen content with a concomitant increase in plasma insulin levels with training may have at least in part contributed to the improved phosphorylation status of PKB.

Since apoptosis has been identified in the SHR model as a critical modulator of maladaptive cardiac remodeling, the following study examined the potential protective effect of exercise training in these, when blood pressure starts to rise sharply at around 4 weeks of age. The phosphorylation status of PKB was markedly improved and associated with a modest increase in GSK-3 β Ser⁹ phosphorylation in the exercised SHR. Bax protein expression was increased in the exercised SHR heart with a concomitant increase in Bcl-2 protein expression which allowed maintenance of the Bcl-2/Bax ratio.

As a whole, the findings of these studies significantly contribute to the understanding of the beneficial effects of exercise training on proteins related to myocardial protection in rats models of *type 2* diabetes and hypertension.

Keywords

Apoptosis

Bcl-2/Bax ratio

Cell survival

Diabetes

Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)

Heat shock protein-72 (HSP-72)

Heart

Hypertension

Insulin

Protein Kinase B (PKB)

Table des Matières

Page titre	i
Page d’approbation.....	ii
Sommaire.....	iii
Mots clés	vi
Summary.....	vii
Keywords.....	ix
Table des matières	x
Liste des tableaux	xvi
Liste des figures.....	xvii
Liste des abréviations	xxi
Remerciements	xxiv
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
Introduction générale	2
Orientation générale de la thèse	5
Aspects généraux de l’apoptose et de la survie cellulaire	6
Apoptose cardiaque, énergie et exercice	10
Les modulateurs de la survie cellulaire et de l’apoptose	12
1) Les protéines de la famille Bcl-2	12
2) La protéine kinase B (PKB/Akt).....	15
a) Aspects généraux.....	15
b) L’activation de PKB par la voie de signalisation de l’insuline.....	15
c) Les fonctions de PKB dans le cœur	18
d) Effets de l’exercice sur PKB	20
3) La glycogène synthase kinase-3 (GSK-3)	21
a) Aspects généraux.....	21
b) Rôle de GSK-3 dans l’hypertrophie cardiaque	22

c) Rôle de GSK-3 dans l'induction de l'apoptose	22
Diabète de <i>type 2</i> et les modulateurs de la survie cellulaire	23
Introduction	23
Principaux problèmes cardiovasculaires associés au diabète de <i>type 2</i> et à la signalisation de l'insuline.....	25
Effets de l'exercice sur la voie signalétique de PKB/GSK-3 dans le cœur diabétique de <i>type 2</i>	30
Hypertension et les modulateurs de la survie cellulaire	31
Introduction	31
Principaux problèmes cardiovasculaires associés à l'hypertension.....	32
Effets de l'exercice sur la protection myocardique du cœur hypertendu	33
Rationnel et objectifs des études	34
Le diabète de <i>type 2</i> : Étude 1 et 2	35
L'hypertension : Étude 3	37
 CHAPITRE 2 : Manuscrit 1	40
<i>PKB and GSK-3 phosphorylation and Bcl-2/Bax ratio in the heart of Zucker diabetic fatty rat with early and late onset of hyperglycemia.</i>	
Page titre	40
Sommaire traduit.....	42
Summary	43
Introduction	44
Methods.....	46
Experimental procedures.....	46

Homogenization and sample preparation.....	47
Analysis of proteins by Western blotting.....	47
Statistics	49
Results	50
Insulin, glucose and glycogen concentration	50
Morphologic data.....	50
PKB phosphorylation.....	51
GSK-3 phosphorylation	51
Bax and Bcl-2 protein expression.....	51
Discussion.....	53
Tables.....	58
Figure Legends.....	60
Figures	61
List of References.....	65
Acknowledgements.....	75
CHAPITRE 3 : MANUSCRIT 2	76
<i>Exercise training attenuated the PKB and</i>	
<i>GSK-3 dephosphorylation in the myocardium of ZDF rats.</i>	
Page titre	76
Sommaire traduit	77
Summary	78
Introduction	79
Materials and Methods	80
Exercise training regimen.....	81
Experimental procedures.....	81
Tissue homogenization and sample preparation.....	82
Western blot analysis	82
Glycogen content and phosphofructokinase activity	83

Statistics.....	83
Results	84
Morphologic data, plasma glucose, insulin levels and glycogen content of the sedentary ZDF rat	84
Effect of exercise on morphologic data, glycemia, insulin levels and glycogen content in the WT and ZDF rat.....	84
Regulation of PKB and GSK-3 phosphorylation in the left ventricle of the sedentary ZDF rat.....	85
Effect of exercise on regulation of PKB and GSK-3 phosphorylation in the left ventricle of WT and ZDF rats	85
Regulation of PKB in skeletal muscle of the sedentary ZDF rat.....	86
Regulation of HSP-72 and PFK in sedentary ZDF	86
Regulation of HSP-72 and PFK in exercised WT and ZDF rats.....	86
Discussion	87
List of figures	94
Tables	95
Reference list.....	97
Figures.....	102
 CHAPITRE 4 : MANUSCRIT 3	 106
<i>Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell survival in spontaneously hypertensive rats.</i>	
Page titre.....	106
Sommaire traduit	107
Summary.....	108
Introduction	109
Methods.....	111
Animals.....	111

Exercise training regimen.....	111
Weekly blood pressure (BP) measurement	112
Measurement of LV function and mean arterial pressure	112
Skeletal muscle COX and cardiac glycogen content.....	112
Homogenization and sample preparation	113
Western blot.....	113
Statistics	114
Results	114
Blood pressure and LV function.....	114
Changes in heart and plantaris muscle weights, skeletal muscle COX activity and cardiac glycogen content following exercise.....	115
The effect of exercise on p85 α expression, phosphorylation of PKB and GSK-3 in the LV of the SHR.....	115
The effect on Bcl-2/Bax and HSP-72 protein expression in the LV of the SHR.....	116
Discussion.....	117
Conclusion.....	120
Figures	122
Acknowledgments	124
Tables	125
Reference list.....	126
Figures.....	135
 CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	 141
Discussion générale	142
Homéostasie du glucose et régulation de PKB et de GSK-3 dans le myocarde diabétique et hypertendu.....	143
Hypertrophie cardiaque et régulation de PKB et de GSK-3	

chez le rat diabétique et hypertendu	151
Régulation des protéines liées à la survie cellulaire chez le rat diabétique et hypertendu.....	152
Conclusion.....	154
CHAPITRE 6 : BIBLIOGRAPHIE.....	156
Annexe : Résumés publiés et présentés à des conférences.....	I
Annexe 1.....	II
Annexe 2.....	IV
Annexe 3.....	VI

Liste des Tableaux

Chapitre 2

Tableau 2-1 :66

Tableau 2-2 :67

Chapitre 3

Tableau 3-1 :95

Tableau 3-2 :96

Chapitre 4

Tableau 4-1 :125

Liste des Figures

Chapitre 1

Figure 1-1:	10
Figure 1-2:	13
Figure 1-3:	14
Figure 1-4:	17

Chapitre 2

Figure 2-1:	62
Figure 2-2:	63
Figure 2-3:	64
Figure 2-4:	65
Figure 2-5:	66
Figure 2-6:	67

Chapitre 3

Figure 3-1:	98
Figure 3-2:	99
Figure 3-3:	100
Figure 3-4:	101

Chapitre 4

Figure 4-1 :	129
Figure 4-2 :	130
Figure 4-3 :	131
Figure 4-4 :	132
Figure 4-5 :	133
Figure 4-6 :	134

Liste des abréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique
AGL :	Acides gras libres
Akt :	Protéine proto-oncogène akt (Synonyme de PKB)
AMPc :	Adénoside monophosphate cyclique
ANOVA :	Analyse de variance
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ATP:	Adénosine triphosphate
BH domain:	Région Bcl-2 homologue
COX:	Cytochrome c oxidase
dP/dt:	Taux de développement de pression
FKHRL1 :	Famille forkhead de facteurs de transcription
GS:	Glycogène synthase
Glut1:	Transporteur de glucose-1
Glut4 :	Transporteur de glucose-4
GSK-3:	Glycogène synthase kinase-3
HSP-72:	Protéine de stress-72
IGF-1 :	Somatomédine 1 (Insulin like growth factor-1)
IKK α :	NF- κ B inhibitor kinase
ILK:	Integrin link kinase
IRS-1:	Insulin receptor substrates-1
K+:	Potassium
LV:	Ventricule gauche

mTOR/FRAP:	Mammalian target of rapamycin
NIDDM:	Non-insulin dependant diabetes mellitus
P85 α :	Sous-unité régulatrice de PI3-kinase
PCNA:	Proliferating cell nuclear antigen
PDH:	Pyruvate dehydrogenase
PDK-1:	Phosphoinositide dependent kinase-1
PFK:	Phosphofructokinase
PFK-2 :	6-phosphofructo-2-kinase
PIP ₂ :	Phosphatidylinisitol biphosphate
PIP ₃ :	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PI3-kinase:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKB:	Protéine kinase B
PKC:	Protéine kinase C
PP2A :	Protéine phosphatase 2 A
p70S6k :	Protéine ribosomale p70-S6 kinase
RAC :	Related to A an C kinases
RV :	Ventricule droit
SDS-PAGE :	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser ⁴⁷³ :	Résidu sérine 473 de PKB
SGK:	Serum and glucocorticoïd-inducible kinase
SHR:	Rat spontanément hypertendu (Spontaneously hypertensive rat)
STZ:	Streptozotocin

TGFBII:	Facteur de croissance des tumeurs beta II (Tumor growth factor beta II)
Thr ³⁰⁸ :	Résidu thréonine 308 de PKB
TNF α :	Facteur nécrosant des tumeurs α (Tumor necrosis factor α)
WT:	Wild type rat
ZDF:	Rat spontanément diabétique de <i>type 2</i> (Zucker diabetic fatty rat)
4E-BP1:	4E binding protein-1

Remerciements

Mes remerciements et toute ma reconnaissance pour la réalisation de cette thèse à ma directrice de recherche, Dr. Louise Béliveau, Ph.D., directrice et professeure au Département de kinésiologie de l'Université de Montréal, pour les connaissances dont elle m'a enrichi, son encadrement et son temps.

J'aimerais également remercier Dr. François Trudeau, Ph.D., professeur au Département des sciences et de l'activité physique de Trois-Rivières, pour m'avoir soutenu dans mes efforts de recherche et Dr. Angelino Calderone Ph.D., chercheur sénior de l'Institut de Cardiologie de Montréal, pour le support et l'orientation éclairée de mes recherches. Sans eux, ce travail n'aurait pas été possible.

Également, je voudrais remercier Manon Jutras pour son support et pour avoir toujours cru dans ce projet laborieux. Sans elle, les durs moments de la recherche auraient été amplement plus difficiles à franchir.

Je voudrais remercier la Faculté des études supérieures pour avoir contribué à mon support financier.

Finalement, je voudrais remercier tous mes amis, entre autres, Alexandre Dumas, pour m'avoir encouragé pendant ces cinq années d'études et pour avoir bien voulu prendre des moments de répit pour décrocher du monde universitaire.

Chapitre 1
Introduction

Introduction générale

Une grande proportion des animaux et des humains diabétiques ou hypertendus meurt des suites d'une ischémie cardiaque (12; 128); ils sont plus susceptibles à des infarctus du myocarde (76) et à la maladie coronarienne (115). Généralement, ces atteintes cardiaques aboutissent à du tissu nécrotique et/ou à l'apoptose lors de la reperfusion. Toute intervention qui permettrait de protéger et de limiter l'étendue de ces dommages serait avantageuse pour le cœur diabétique ou hypertendu. L'activité physique pourrait faire partie de ces interventions. Habituellement, l'entraînement physique exerce des effets prononcés sur l'état général des individus atteints du diabète de *type 2* ou d'hypertension. Par exemple, il favoriserait la réduction du risque de maladie du cœur et améliorerait plusieurs variables associées aux cardiopathies diabétiques (91). De plus, l'entraînement physique favoriserait la réduction de la pression sanguine de repos (192) chez approximativement 75% des individus hypertendus (77), ce qui pourrait amoindrir la charge de travail imposée ou améliorer le métabolisme cardiaque. Un autre effet potentiel qui pourrait être important est la protection myocardique. En effet, même si l'exercice peut réduire la pression sanguine, la majorité de ces individus qui améliorent leur pression sanguine ou leur métabolisme par l'exercice demeurent hypertendus ou diabétiques (77). Ainsi, il importe de vérifier si l'exercice chronique permet d'améliorer la protection du cœur en contrecarrant l'apoptose dans les cardiomyopathies diabétiques ou hypertensives (67; 118). Par exemple, un déséquilibre énergétique cellulaire pourrait faire en sorte de réduire la protection myocardique en réduisant l'expression des protéines protectrices et en augmentant

l'activité des protéines pro-apoptotiques, favorisant ainsi la perte de cellules dans le myocarde. Il semble plausible que l'exercice chronique puisse améliorer la protection myocardique contre l'apoptose, puisque l'exercice favorise l'expression de plusieurs protéines mitochondriales liées à l'apport énergétique, et que l'apoptose est aussi liée à l'intégrité et au statut énergétique de la mitochondrie. D'ailleurs, l'exercice chronique améliore les performances cardiaques, la densité capillaire, la captation de glucose, la production d'énergie mitochondriale et augmente les densités mitochondriale et myofibrillaire chez des rats diabétiques ou hypertendus et ce, sans accroître de façon substantielle l'hypertrophie (42; 131; 145; 150).

Un déséquilibre entre la production et les besoins en énergie de la cellule engendrerait des modifications aux niveaux des effecteurs signalétiques, fonctionnels et de l'expression génétique en relation à la survie cellulaire du cœur (51). Ainsi, la résistance à l'insuline pourrait être néfaste pour le cœur diabétique ou hypertendu, puisque les mécanismes de survie cellulaire sont souvent dépendants d'un apport énergétique adéquat en glucides (51). De même, la voie signalétique de l'insuline gouverne d'importants effecteurs cellulaires pour le maintien de l'homéostasie énergétique, la croissance et la survie cellulaire. L'amélioration de la signalisation de l'insuline est particulièrement importante pour la survie cellulaire du cœur diabétique ou hypertendu, puisque ceux-ci sont souvent résistants à l'insuline (25; 56; 75; 135; 164; 188; 216). La régulation des molécules intracellulaires liées à l'action de l'insuline, tel que la protéine kinase B (PKB) et la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3), pourrait être altérée dans le myocarde diabétique ou hypertendu, parce qu'il a été démontré que des souris transgéniques qui n'expriment pas PKB révèlent plusieurs

similitudes avec le diabète de *type 2* observé chez les humains, comme l'hyperglycémie, une insulinémie élevée, et une résistance à l'insuline dans le foie et le muscle (33; 113; 113). L'entraînement physique pourrait être une intervention efficace, puisqu'il diminue la résistance à l'insuline (170). Il pourrait aussi favoriser le développement d'une réponse protectrice spécifique au cœur en améliorant la régulation de la voie signalétique de l'insuline et plus particulièrement la régulation de PKB et de ses effecteurs. Par exemple, l'augmentation de la phosphorylation de GSK-3 β et la diminution de son activité amélioreraient la fonction cardiaque post-ischémique et réduirait l'étendue de l'infarctus (193). Ainsi, l'impact de l'exercice chronique pourrait être avantageux pour accroître la protection contre la dégradation progressive de la fonction cardiaque et du phénotype métabolique et contractile du cœur diabétique et hypertendu. Par contre, cette protection myocardique contre des stress aigus tel que l'ischémie ne peut être généralisée, puisque le degré de protection myocardique serait dépendant de la durée et du degré de l'ischémie, de la sévérité du diabète, du modèle d'animaux utilisés et du niveau des substrats énergétiques circulants (149). En général, la plupart des recherches tendent à démontrer que le cœur serait moins vulnérable à de l'ischémie lorsque les modèles expérimentaux qui induisent le diabète sont de courte durée et que seul le glucose a été utilisé. Au contraire, le myocarde serait plus vulnérable à de l'ischémie, à une diminution de la fonction ou à des lésions, lorsque la durée du diabète est prolongée et que des acides gras ont été utilisés (1; 86; 149; 217). Néanmoins, l'amélioration phénotypique du cœur diabétique par l'exercice chronique pourrait accroître de façon substantielle la protection lors de stress aigu tel que l'ischémie du myocarde. En effet, Paulson and al.

(150) ont démontré que l'exercice chronique améliore la tolérance du cœur diabétique à l'ischémie cardiaque.

Orientation générale de la thèse

Cette thèse traitera principalement de la régulation de certaines protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline, le métabolisme énergétique, la protection et la survie cellulaire dans le myocarde de rats génétiquement diabétique de *type 2* (ZDF) et de rats spontanément hypertendus (SHR). Dans le premier chapitre nous présenterons premièrement ce que sont la mort programmée cellulaire et la survie cellulaire dans le cœur. En second lieu, nous décrirons le rôle des principales protéines liées à la protection cellulaire qui sont couplées au métabolisme énergétique dans le cœur. Troisièmement, nous traiterons des principaux problèmes cardiaques associés au diabète de *type 2* et à l'hypertension. Plus précisément, nous décrirons les principaux effets du diabète de *type 2* et de l'hypertension sur la régulation de la voie PKB/GSK-3 dans le myocarde. Quatrièmement, nous décrirons les effets potentiels de l'exercice sur l'expression de certaines protéines liées à la survie cellulaire et à la signalisation de l'insuline. Par la suite, les trois études qui seront présentées dans cette thèse traiteront toutes de la régulation de PKB et de GSK-3 et de leurs principaux substrats dans le myocarde de rats ZDF et SHR. La première étude traitera de la régulation des protéines pro- et anti-apoptotique dans des cœurs de rats ZDF au début du diabète de *type 2*. La deuxième étude évaluera l'effet d'un entraînement physique sur la régulation de la voie PKB/GSK-3 dans le myocarde de rats ZDF sévèrement atteints du diabète de *type 2*. La troisième étude traitera des effets de l'entraînement

sur la fonction cardiaque et la régulation des protéines cardio-protectrices dans le myocarde de rats hypertendus. Finalement, nous évaluerons et discuterons de l'impact de l'exercice et des mécanismes impliqués dans la régulation des molécules clés de la voie signalétique de l'insuline qui sont impliquées dans la survie cellulaire et qui sont distinctes et/ou commune aux deux pathologies dans le cœur.

Aspects généraux de l'apoptose et de la survie cellulaire.

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est une composante essentielle d'un développement normal, et aussi une réaction à certains états anormaux. Il ne fait aucun doute que la mitochondrie régularise l'apoptose (185). Ce processus apoptotique s'effectue en trois phases : une phase pré-mitochondriale qui active une cascade de signaux de transduction; une phase mitochondriale qui induit la perte de fonction membranaire; et une phase post-mitochondriale qui promouvoit l'activation des protéases et des nucléases (185). Cependant, d'autres organelles peuvent déclancher l'apoptose indépendamment des mitochondries (61). Par exemple; le réticulum endoplasmique (54), les lysosomes et l'appareil de Golgi (61). L'apoptose serait initiée par deux voies apoptotiques distinctes; la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, qui promouvoit l'activation d'une cascade de caspases. La voie extrinsèque serait initiée via les « death receptors » et la voie intrinsèque serait initiée par des mécanismes au sein même de la cellule. Les « death receptors » de la voie extrinsèque comme; Fas, TNF-R1, TNF-R2 et DR3/4/5/6 induisent l'apoptose lorsqu'ils sont activée par la liaison de ligands analogues comme; FasL, TNF α , LT α , Apo-3L et TRAIL. L'induction de l'apoptose et l'activation des caspases dépendent de l'activité cytosolique de plusieurs peptides signalétiques avec le domaine mortel des « death receptors » pour former un complexe nommé DISC

« death-inducing signal complexes ». Le déroulement subséquent de la voie apoptotique extrinsèque s'apparente à la voie intrinsèque. La voie intrinsèque est caractérisé par une perte d'intégrité de la membrane externe de la mitochondrie et accompagnée de la sortie du cytochrome c. Le largage du cytochrome c et sa liaison avec Apaf-1, caspase-9 et dATP induit la formation d'un complexe protéique cytosolique nommé apoptosome (figure 1,1). L'apoptosome active des protéines protéolytiques telle que la caspase-3, une protéine clé dans la cascade des événements pour l'induction de l'apoptose (166). Au cours du processus apoptotique, la cellule mourante se désassemble; son noyau se condense et son ADN se sectionne sous l'effet des caspases et cela constituerait un point de non-retour de la mort cellulaire programmée. Ce désassemblage permet à la cellule apoptotique d'utiliser la membrane cytoplasmique pour emballer son contenu et former de petites sphères appelées «corps apoptotiques». Par la suite, les phagocytes du système immunitaire débarrassent l'organisme de ces déchets apoptotiques, ce qui contrairement à la nécrose ne laisserait pas de cicatrice apparente. La condensation de la chromatine, le rétrécissement cytoplasmique, les bulles membranaires, la fragmentation nucléaire et la formation de corps apoptotiques sont des caractéristiques physiques de l'apoptose.

L'apoptose est un processus actif étroitement régulé par les gènes et qui peut être provoqué par une multitude de conditions physiologiques et pathologiques (208). Le cardiomyocyte par exemple, a la potentialité d'exprimer des protéines spécifiques qui peuvent contrecarrer les effets néfastes des protéines pro-apoptotiques afin d'atténuer l'initiation de l'apoptose à la mitochondrie. Ainsi, tout comme l'induction de l'apoptose, la survie cellulaire programmée serait aussi un processus actif étroitement régulé par les gènes et se distinguerait par un noyau cellulaire intact et fonctionnel, alors que

l'apoptose provoquerait la fragmentation de l'ADN et une disparition du noyau cellulaire. Parmi la pléiade de molécules protectrices qui seraient favorables à la survie cellulaire on distingue plus particulièrement, les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, la protéine kinase B (PKB) et la protéine de stress HSP-72. À l'opposé, les principales molécules pro-apoptotiques effectives à la membrane mitochondriale et qui sont régulièrement répertoriées dans la littérature sont les protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2 et GSK-3. Ces dernières seront décrites de façon plus exhaustive ultérieurement.

La nécrose et l'apoptose sont les deux formes de mort cellulaire qui sont bien définies. Le programme génétique induit l'apoptose en activant les caspases qui vont désassembler la cellule pour produire une apparence morphologique caractéristique de l'apoptose. En opposition à l'apoptose, la nécrose serait considérée comme un processus inhabituel qui surviendrait en réponse à des agents toxiques et/ou à des lésions physiques. Cette forme de mort cellulaire est caractérisée morphologiquement par un gonflement de la mitochondrie, par la formation de vacuole cytoplasmique et par une perméabilité accrue de la membrane plasmique sans dommage apparent au noyau cellulaire. Cependant, il existe maintenant un bon nombre d'étude qui rapportent des formes additionnelles de mort cellulaire affichant des caractéristiques hybrides « apoptosis-like et necrosis-like programmed cell death ». Par exemple, Vande Velde et al. (200) ont démontré que la surexpression d'une molécule dénommée BNIP3 activerait une voie signalétique de mort cellulaire lorsqu'elle est intégrée à la membrane externe de la mitochondrie. Cette voie signalétique requiert l'ouverture des « permeability transition pore » (PTP) à la mitochondrie et provoquerait la mort cellulaire sans faire intervenir

l'activation des caspases, Apaf-1 et la libération du cytochrome c (200). Cette forme de mort cellulaire se manifeste par une dysfonction mitochondriale, par des dommages membranaires et par une morphologie similaire à la nécrose. Paradoxalement, cette mort cellulaire a aussi des attributs qui sont apparentés à l'apoptose de part la fragmentation de l'ADN (200). En d'autres mots, il est possible que la nécrose et l'apoptose partagent certains mécanismes mitochondriaux qui induisent la mort cellulaire comme l'ouverture des PT pores, la perte du gradient protonique électrochimique ($\Delta\Psi_m$) et la production de réactifs qui réagissent à l'oxygène (ROS). Il est suggéré que l'issue de la mort cellulaire entre l'apoptose et la nécrose serait dépendante de la disponibilité des protéases pro-apoptose (88). Il existerait aussi d'autres mécanismes tels que l'« apoptosis inducing factor » (AIF), « smac/diablo » (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein of low pI, endonuclase G (EndoG) et Omi/Htr-A2 qui provoqueraient l'apoptose suite à des signaux apoptotiques (10). Le largage de l'AIF dans le cytosol à partir de la mitochondrie provoqueraient la fragmentation de l'ADN et l'apoptose après que ceux-ci est migré au noyau de la cellule et ce, indépendamment de l'activation des caspases et/ou d'Apaf-1 (26) (figure 1,1). Ce dernier mécanisme ne fait pas l'unanimité dans la littérature (10).

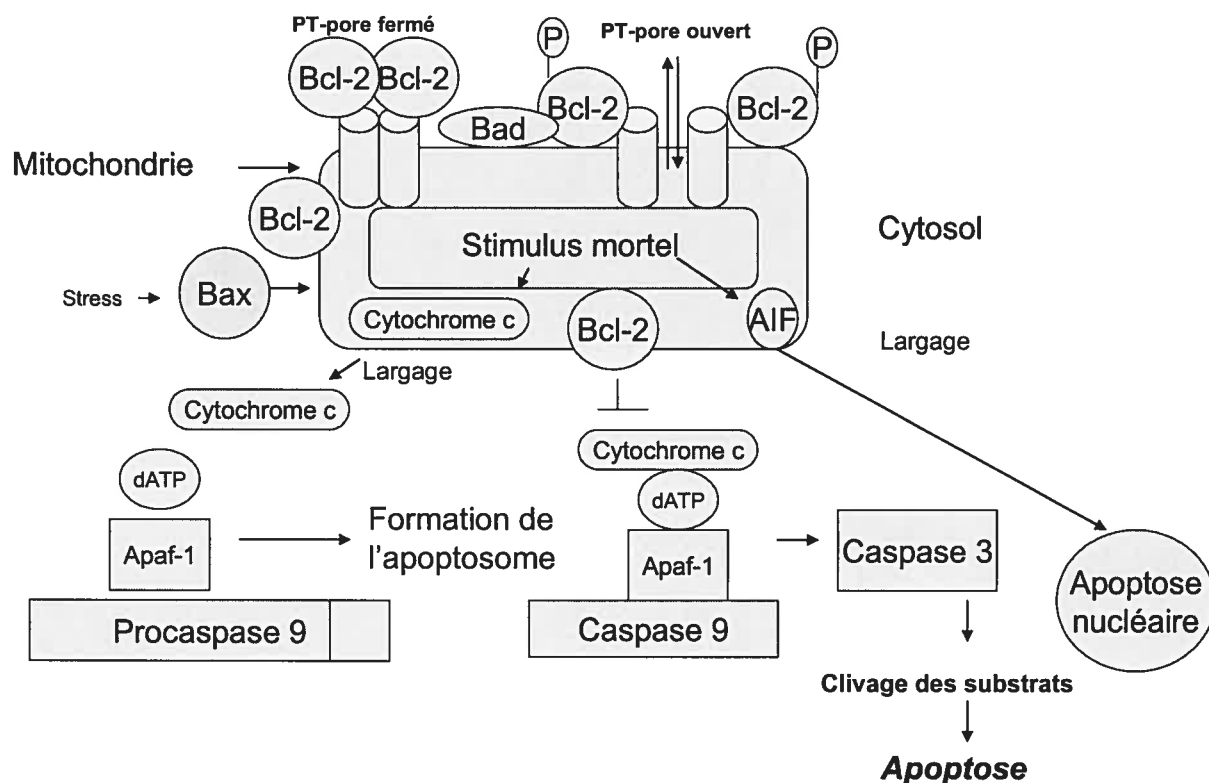


Figure 1,1

Apoptose cardiaque, énergie et exercice

L'induction de l'apoptose nécessite de l'énergie et une déplétion sévère en ATP engendre plutôt de la nécrose que de l'apoptose (58; 174). L'apoptose et la nécrose sont observables dans le myocarde humain ayant subi un infarctus (142; 202). L'activation de la voie apoptotique est aussi observable dans le myocarde humain en voie de décompensation (168). Généralement, les myocytes apoptotiques sont absents d'une région profondément ischémique du myocarde, là où l'on observe de la nécrose, mais plus prévalents dans des régions hypo-perfusées (143). Par exemple, après une occlusion

de l'approvisionnement en sang dans le myocarde, l'apoptose et la nécrose sont activées. Dans ce cas, le programme de mort cellulaire est activé par la lésion ischémique. Si l'approvisionnement en sang n'est pas rétabli, les cellules apoptotiques meurent de nécrose parce que l'énergie pour continuer le processus apoptotique n'est plus disponible. Si l'approvisionnement en sang revient rapidement, plusieurs cellules pourront être perdues par apoptose en complétant leurs programmes de suicide cellulaire. D'ailleurs, l'apparition de l'apoptose serait accélérée dans le myocarde en re-perfusion (202). L'apoptose cardiaque résulterait souvent d'un stress modéré qui est répétitif ou chronique (51), comme la décompensation cardiaque (142; 166) ou les cardiomyopathies diabétiques ou hypertensives humaines (67; 118). Un déséquilibre énergétique cellulaire pourrait faire en sorte de réduire la protection myocardique lors d'une situation imprévue et décisive à la survie cellulaire en réduisant l'expression des protéines protectrices et en augmentant l'activité des protéines pro-apoptotiques. L'activation de la voie apoptotique serait accompagnée d'une altération au niveau de la captation et du métabolisme du glucose (132) et d'une diminution de la production anaérobie d'ATP (17), ce qui pourrait être un problème important dans le cas de la cardiomyopathie diabétique ou hypertensive, puisque ces derniers sont prédisposés à de l'ischémie. Par contre, les bénéfices inhérents à une augmentation d'un status anti/pro-apoptotique par l'exercice chronique contre l'ischémie reperfusion reste à être démontré puisque la nécrose semble être largement dominante.

Les modulateurs de la survie cellulaire et de l'apoptose

1) Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont parmi les médiateurs de la régulation de la survie cellulaire les plus répertoriés de la littérature (figure 1,2). La famille Bcl-2 regroupe des protéines pro- et anti-apoptotiques. Les anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont : Bcl-2, BCLW, BCLXL, Ced-9, MCL1, NR13, A1/BFL1 et BCLXL Δ TM. Les pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont : Bax, BAK, BOK/MTD, DIVA, BCLXS, BIK/NBK, HRK/DP5, BIM/BOOD, BLK, NIP3, NIX/BNI, p3L, BAD, BID et EGL1. Tous les membres de la famille Bcl-2 possèdent une région Bcl-2 homologue (BH) avec l'un des quatre motifs BH1 à BH4 (figure 1,3). Ces régions spécifiques servent de site de liaison pour les autres membres de la famille Bcl-2 dans le but de former des homo- ou hétérodimères, afin de neutraliser ou d'initier l'apoptose par des liens protéines à protéines. Les protéines de la famille Bcl-2 qui sont les plus abondantes dans l'organisme sont Bcl-2, Bax et Bcl-X_L. La majorité des membres de la famille Bcl-2 exercent leurs fonctions sur la mitochondrie. Ainsi, les protéines de cette famille sont d'importants régulateurs des fonctions mitochondriales cardiaques lors d'un stress induisant l'apoptose (41). Par exemple, suite à un stimulus pro-apoptotique, comme une diminution du contenu en ATP, ou en glucose, la protéine pro-apoptotique Bax transiterait du cytosol à la mitochondrie pour y être insérée (167; 201; 212). Subséquemment, Bax induirait directement le largage du cytochrome c à partir de la mitochondrie (98). L'augmentation de l'expression de Bcl-2 quant à elle préviendrait le largage du cytochrome c en plus de prévenir l'activation des caspases (172). Par exemple, la sur-expression de Bcl-2 pourrait contrecarrer

l'initiation de l'apoptose dans des conditions de déplétion en ATP dans le cœur (126). Il a été suggéré que Bcl-2 induise un état d'hibernation métabolique qui pourrait améliorer la résistance de la cellule à des conditions de stress (69). Contrairement à Bax, Bcl-2 est une protéine trans-membranaire insérée dans la mitochondrie (89), elle favorise la survie cellulaire en neutralisant par hétérodimérisation les effets de Bax *in vivo* (figure 1,2). Lorsque Bcl-2 est en excès, l'hétérodimère Bcl-2/Bax est formé et la cellule est protégée. Cependant, lorsque Bax prédomine, une homodimérisation prend place, et la cellule devient susceptible à l'apoptose (144). Le ratio entre l'expression de Bcl-2 et Bax a été proposé comme étant un important marqueur de la probabilité de la survie cellulaire. Dans le cardiomyocyte ischémiq, l'expression du gène Bcl-2 serait diminuée, alors que l'expression de Bax serait augmentée *in vivo* (116). Jusqu'à maintenant, aucune étude à notre connaissance n'a été entreprise pour observer les effets de l'exercice sur les changements d'expression des protéines pro-survie dans des cœurs soumis à un stress chronique, comme dans les cas du diabète et de l'hypertension, qui sont plus susceptibles à des détériorations graves et irréversibles comme la nécrose et l'apoptose.

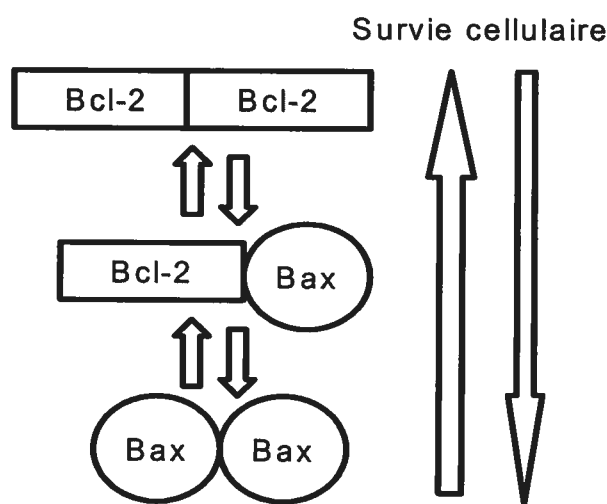
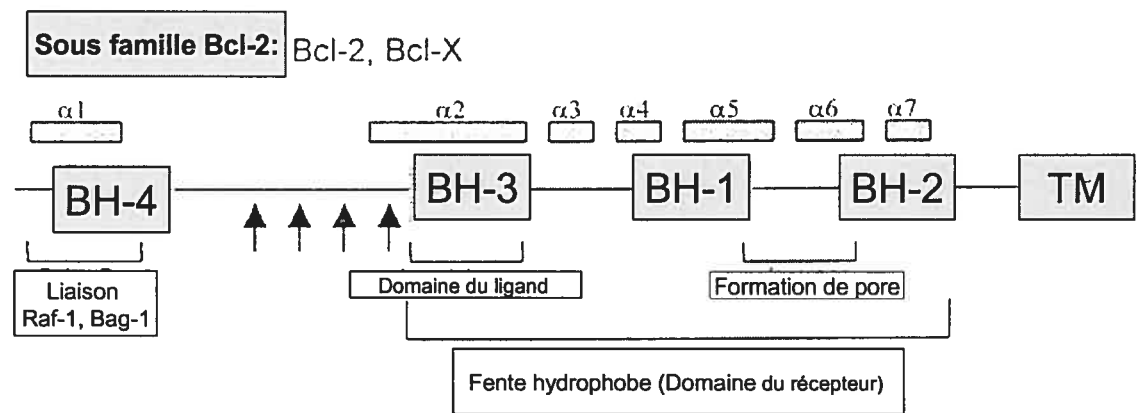


Figure 1,2

Mort cellulaire

Anti-apoptose



Pro-apoptose

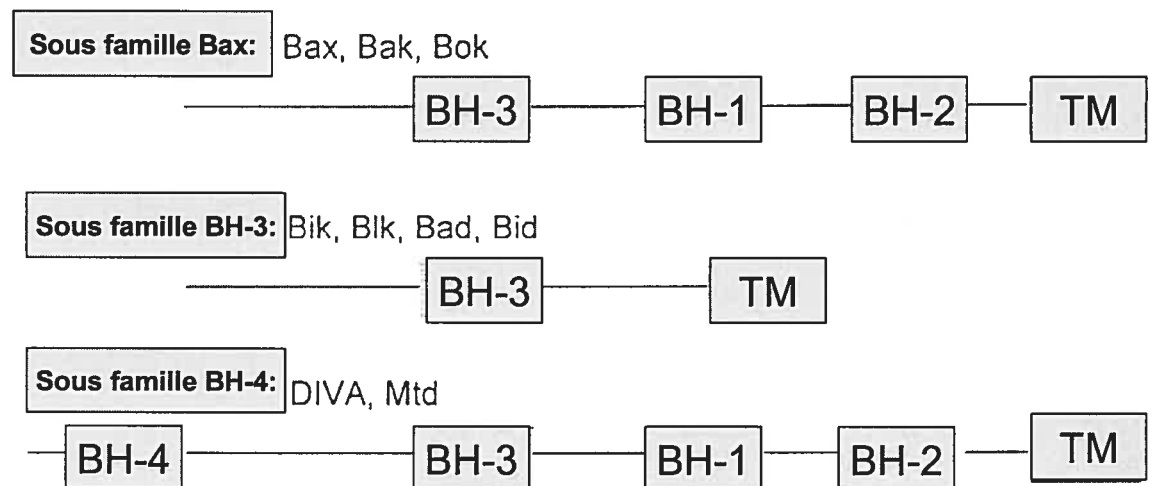


Figure 1,3

2) La protéine kinase B (PKB/Akt)

a) Aspects généraux.

La kinase sérine/thréonine PKB est aussi connue sous le nom de c-Akt (Akt1-3) qui est l'homologue cellulaire de l'oncogène viral v-Akt et de Rac. L'origine de PKB provient d'un rétrovirus appelé AKT8 qui a été isolé d'un thymome à partir d'une lignée de cellules en provenance d'une souche de souris nommée AKR qui a une haute incidence de leucémie et de lymphome (181). Deux homologues humaines, Akt-1 et Akt-2, ont été clonées, et elles sont abondamment exprimées dans le cœur (37; 37; 180). Les locus de Akt1 et Akt2 ont été respectivement localisés sur les chromosomes 14q32 et 19q13.1-q13.2. L'homologue cellulaire de v-akt a été cloné par plusieurs groupes indépendants, qui ont tous démontré que la protéine kinase sérine/thréonine avait un poids moléculaire de 57 kDa. La PKB joue un rôle important dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires, tels que la transcription des gènes, la synthèse protéique, le métabolisme du glucose, le cycle cellulaire et la survie cellulaire (99). Entre autres, la PKB est une enzyme clé impliquée comme facteur intégral de l'homéostasie du glucose.

b) L'activation de PKB par la voie de signalisation de l'insuline

PKB est activée par un signal intracellulaire, via la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), suite à la stimulation par certains facteurs de croissance comme l'angiotensine II (189) et l'insuline (44; 84) (figure 1,4). L'insuline agit en se liant à son récepteur au niveau de la membrane cellulaire. Le récepteur à l'insuline est une glycoprotéine hétérotétramère composée de deux sous-unités α et de deux sous-unités β ayant une fonction tyrosine kinase. La liaison de l'insuline à la sous-unité α du récepteur

à insuline cause une augmentation de l'activité tyrosine kinase de la sous-unité β intracellulaire, ce qui favorise l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline et la phosphorylation tyrosine sur des protéines intracellulaires dont les principales sont les «Insulin Receptor Substrates» (IRS). La phosphorylation tyrosine de la molécule IRS-1 agit comme protéine d'arrimage pour des molécules signalétiques situées en aval de la voie signalétique de PI3-K. La PI3-K posséderait deux activités kinases, l'une lipidique et l'autre protéique en plus d'être constituée de deux sous-unités, l'une catalytique (p110) et l'autre régulatrice (p85). L'interaction IRS/PI3-kinase catalysera la conversion de PI-4,5-(PO_4)₂ en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) à la membrane cellulaire, pour servir de régulateur allostérique à une autre kinase nommée phosphoinositide-dependent kinase (PDK-1) qui contrôle la phosphorylation de résidus phosphate dans la boucle d'activation de ses principaux effecteurs. Les principaux effecteurs immédiats et en aval de PDK 1 sont PKB/Akt, p70S6K, protéine kinase C (PKC) λ/ζ , PKC-related kinase-1 et serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK). PKB serait activée par la liaison d'un phospholipide et par la phosphorylation de la boucle d'activation sur un résidu thréonine Thr³⁰⁸ par PDK-1 (7) et aussi sur le terminal acide (C-terminus) hydrophobe sérine Ser⁴⁷³ par une autre molécule inconnue nommée PDK-2. PKB serait biologiquement active suite à une phosphorylation de ses deux résidus PKB Ser⁴⁷³ et Thr³⁰⁸. La double phosphorylation serait critique pour obtenir un haut niveau d'activation de PKB (7). Le recrutement de PKB par PDK-1 va subséquentment diriger PKB à la membrane cellulaire et au noyau (8), puisque PKB a la possibilité de se lier à des lipides phosphorylés de par son domaine terminal aminé dénommé «pleckstrin homology (PH)». L'activité de PKB serait régularisée négativement par déphosphorylation par

l'intermédiaire de phosphatases. La phosphatase 2A (PP2A) pourrait être l'une des enzymes clés associée avec la déphosphorylation de PKB *in vitro et in vivo* (7; 129). D'ailleurs, l'activité de PKB serait augmentée par des inhibiteurs des phosphatases tels que le vanadate, la calyculin A et l'acide okadaïque. PKB est un effecteur cellulaire qui régularise plusieurs autres kinases et fonctions spécifiques dans les différents tissus des mammifères. Les principales cibles et fonctions de PKB dans le myocarde sont discutées ultérieurement dans cette thèse.

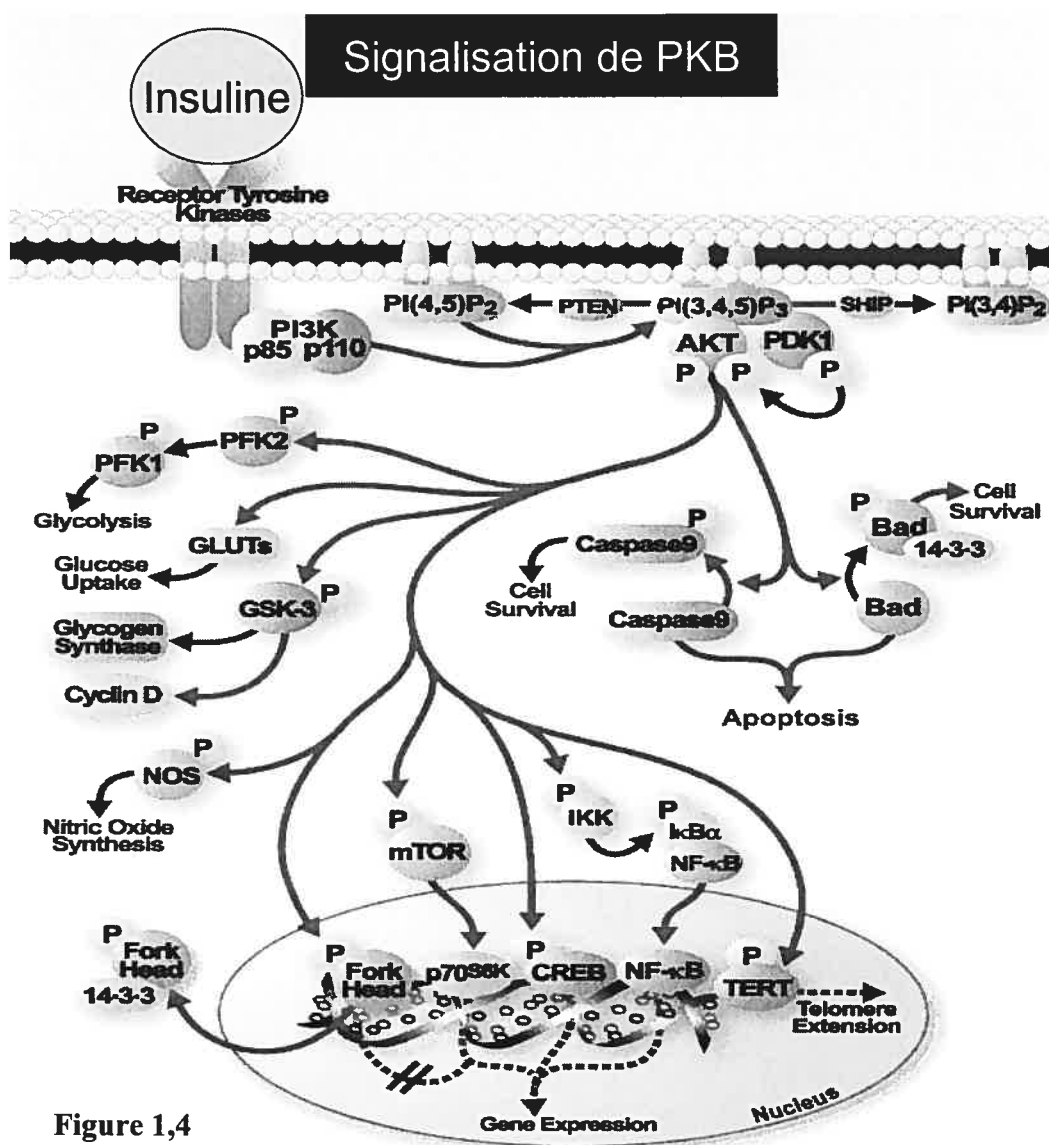


Figure 1,4

c) Les fonctions de PKB dans le cœur

PKB jouerait un rôle important au niveau du métabolisme et de l'expression génétique cardiaque. Elle serait impliquée dans la régulation des enzymes liées au métabolisme des protéines, des glucides et des lipides dans les tissus qui sont sensibles à l'insuline. Ainsi, PKB pourrait régulariser la traduction des protéines et l'hypertrophie myocardique (49) via la voie PI3-K. La régulation de la masse cardiaque par PKB pourrait être reliée au couplage entre la charge hémodynamique et les besoins métaboliques du cœur. Des études récentes ont démontré que PKB serait associé à l'hypertrophie des cellules myocardiques dans des souris transgéniques surexprimant PKB (39) et PKB serait activée par l'augmentation du travail contractile (13). PKB modulerait la synthèse protéique en régularisant l'activité du facteur de transcription 4E-BP1 via mTOR/FRAP suite à l'activation par des facteurs de croissance, des agents myogènes et des hormones (71; 151). La régulation de l'activité de mTOR/FRAP par PKB activerait aussi la protéine ribosomale p70-S6 kinase (p70S6k) impliquée dans la traduction et l'élongation ribosomale (95). Aussi, l'augmentation de l'activité de PKB promulgue la transcription de c-myc, un gène qui répond rapidement à un stimulus hypertrophique et à la progression du cycle cellulaire (3). PKB promulgue l'augmentation du niveau de cyclin D1 dans le noyau cellulaire en induisant la translocation nucléaire et la traduction de l'ARNm, ce qui pourrait augmenter la progression du cycle cellulaire (99).

PKB maintient l'intégrité mitochondriale par des mécanismes dépendants de l'activité PI3-kinase (28; 45; 214) lorsque l'approvisionnement en glucose est suffisant (36; 44; 99). Ainsi, l'homéostasie du glucose à l'intérieur de la cellule s'avère important

pour le cœur, puisque PKB favorise à la membrane mitochondriale, le couplage entre le métabolisme glucidique et la phosphorylation oxydative via une augmentation du couplage hexokinase-VDAC (voltage dependant anion channel) (74). Ce dernier améliore non seulement le métabolisme du glucose mais inhibe l'ouverture du pore de perméabilité transitionnelle (PT pore), un des mécanismes de relâche de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie. Ainsi, le contrôle de l'entrée du glucose et la progression du glucose dans la glycolyse sont primordiaux pour maintenir la protection des cellules cardiaques. PKB provoquerait la translocation du GLUT-4 d'un compartiment intracellulaire à la membrane plasmique dans le cœur de rat et dans des cœurs isolés (105; 176). De plus, l'augmentation du travail contractile en soi stimule la glycolyse cardiaque et augmenterait le transport du glucose et l'activité d'un enzyme clé de la glycolyse cardiaque la 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2) (50) et PKB serait possiblement l'un des médiateurs de l'augmentation de l'activité de la PFK-2 lorsque le travail contractile est accru (13; 52).

PKB aurait plusieurs fonctions protectrices dans le myocarde. PKB promulgue la survie cellulaire en contrecarrant certains stimulus apoptotiques par phosphorylation directe ou indirecte de certaines protéines régulatrices de l'apoptose ou par des modifications post-translationnelles (99). Il a été suggéré que les facteurs de croissance comme l'insuline et l'insuline like growth factor-1 (IGF-1) activeraient PKB et favoriserait la survie des cardiomyocytes *in vitro* en plus de protéger contre les dommages d'ischémie/reperfusion chez des souris et les rats (57; 68; 97). De plus, PKB préviendrait aussi les stress d'oxydation qui induisent l'apoptose dans les cardiomyocytes (4). De même, le transfert par adénovirus d'un gène actif de PKB améliore la fonction et

la protection myocardique dans des cœurs en voie de décompensation (190). PKB semblerait inhiber l'exécution de l'apoptose par phosphorylation et inactivation de Bad, une protéine de la famille de Bcl-2. PKB activerait des molécules pro-survie telles que FLIP et IKK α (45; 146; 183). PKB promulgue aussi la survie cellulaire en prévenant l'expression du ligand FAS par un processus de phosphorylation et d'inactivation du facteur de transcription forkhead (FKHRL1) (22). L'effet anti-apoptotique de PKB serait effectif avant le relâchement du cytochrome c, ce qui empêcherait l'activation des caspases (103).

d) Effets de l'exercice sur PKB

L'effet de l'exercice aigu ou chronique sur l'activité de PKB dans le cœur n'a jamais été rapporté dans la littérature à notre connaissance. Le peu d'études traitant des effets de l'entraînement chronique sur PKB ont été réalisées dans le muscle squelettique et surtout en lien avec le transport du glucose. Ainsi, Luciano et al. (123) ont observé chez le rat qu'un entraînement de 6 semaines à la nage augmentait la phosphorylation de PKB Ser⁴⁷³ dans le muscle squelettique suite à une infusion d'insuline. Cette augmentation de la phosphorylation de PKB était accompagnée d'une meilleure réponse à l'insuline pour induire l'expression du GLUT-4. D'ailleurs, la phosphorylation de PKB, un intermédiaire signalétique putatif du GLUT-4 (206), serait augmentée de 640% en réponse à l'insuline, de 280% par l'exercice et de 1000% pour l'exercice combiné à l'insuline dans le muscle squelettique humain (190). L'insuline stimule la translocation de la protéine GLUT-4 jusqu'à la membrane, et elle augmente la capacité de transport du glucose (203). Par contre, la captation en glucose pourrait aussi être améliorée par un

mécanisme indépendant de la stimulation de l'insuline via PI3-K et qui impliquerait PKB. Il a été suggéré que l'insuline n'active que modérément PKB dans le muscle squelettique de souris n'exprimant pas de récepteur à insuline, alors que l'addition de l'exercice peut améliorer de façon plus marquée l'activité de PKB (73; 210). Il existe d'autres évidences dans la littérature qui démontrent que PKB pourrait être activée par une voie indépendante de la voie PI3-K et qui pourrait être activée par l'exercice. Par exemple, l'AMPc (63), la stimulation β -adrénergique (137), l'hyperosmolarité et les chocs thermiques activent PKB, et ce en présence de Wortmannin, un inhibiteur bien connu de la voie signalétique PI3-K (23; 23; 106). Certains enzymes qui ne sont pas nécessairement couplés à la voie PI3-K activeraient PKB. Par exemple, l'enzyme intégrin link kinase (ILK) inhiberait spécifiquement la phosphorylation du résidu PKB Ser⁴⁷³ et l'activité de PKB (124; 152) en plus de phosphoryler GSK-3 (47; 153; 196).

3) La glycogène synthase kinase-3 (GSK-3)

a) Aspects généraux

La glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) participe à la régulation de plusieurs processus cellulaires fondamentaux comme le métabolisme des glucides, la synthèse protéique et l'apoptose. La GSK-3 est une protéine kinase sérine/thréonine connue sous deux isoformes, GSK-3 α (serine²¹) et GSK-3 β (serine⁹), qui sont exprimées de façon ubiquitaire dans tous les tissus mammifères (213). GSK-3 β aurait un poids moléculaire de 47 kD, alors que la GSK-3 α est détectée à 51 kD. Le plus étudié des isoformes est la GSK-3 β , qui aurait 85% d'homologie en acides aminés à GSK-3 α (213). Ces deux isoformes sont à 97% homologues à l'intérieur de leurs domaines catalytiques, mais

différent significativement à l'extérieur de cette région, puisque GSK-3 α posséderait une plus longue queue riche en glycine au terminal azoté (65). Ceci pourrait conférer aux isoformes des rôles spécifiques dans la cellule. Le rôle de GSK-3 pour la synthèse du glycogène stimulée par l'insuline est bien caractérisé dans la littérature (184). L'insuline promulgue la phosphorylation de GSK-3 via PKB, ce qui désactive l'enzyme afin de maintenir la déphosphorylation de la glycogène synthase (GS) et de promouvoir la synthèse de glycogène (43; 99; 184) et l'activation de la protéine phosphatase-1 (PP1) (19).

b) Rôle de GSK-3 dans l'hypertrophie cardiaque

Les cardiomyopathies qui sont sujettes à une demande métabolique accrue et à de l'hypertrophie impliqueraient aussi l'axe PKB/GSK-3. D'ailleurs, l'inhibition de l'activité de GSK-3 β par l'Endothelin-1, la Calyculin, la phényléphrine, le chlorure de lithium et la surcharge de pression promulgue l'hypertrophie dans les cardiomyocytes (81). À l'opposé, l'augmentation de l'activité de GSK-3 β par déphosphorylation dans le cœur de souris transgéniques abolit l'hypertrophie myocardique (9).

c) Rôle de GSK-3 dans l'induction de l'apoptose

L'un des rôles clé de la voie pro-survie de PI3K/PKB chez l'humain serait de supprimer l'activité de GSK-3. La perte en facteurs de croissance favoriserait l'augmentation de l'activité de GSK-3 et l'induction de l'apoptose. Pap et al. (147) ont démontré que la GSK-3 pourrait contribuer aux effets de PKB sur l'apoptose. La sur-expression de GSK-3 induit l'apoptose, alors que la phosphorylation et l'inactivation de

GSK-3 par PKB bloque l'apoptose *in vitro* (148). Par exemple, l'inhibition de GSK-3 β atténue de façon marquée l'apoptose induite par l'hypoxie *in vitro* en présence de glucose (119). L'augmentation de l'activité de GSK-3 serait associée à un changement de conformation de la protéine pro-apoptotique Bax et à l'induction de la mort cellulaire d'érythrocytes primaires humain (178). La sur-expression de GSK-3 β et sa translocation au noyau nucléaire *in vitro* stimulerait les cellules à devenir apoptotiques de façon spontanés en absence de sérum et par un traitement choc à la chaleur en plus d'inhiber la transcription de la protéine de stress HSP-72 (18; 65; 83; 147; 147). La régulation de GSK-3 α/β par l'exercice dans le cœur n'est pas connue à notre connaissance.

Le diabète de *type 2* et les modulateurs de la survie cellulaire

Introduction

Le diabète de *type 2* ou NIDDM (non-insulin-dependant diabetes mellitus), la forme la plus commune de diabète (90-95% des cas de diabète chez les plus de 20 ans), est souvent caractérisé par des événements altérés qui surviennent en aval de la liaison de l'insuline à son récepteur. La progression du diabète de *type 2* est un processus en deux étapes : une résistance périphérique à l'action de l'insuline, qui est souvent exacerbée par l'obésité, et une incapacité du pancréas à sécréter l'insuline pour compenser cette résistance. Les patients atteints du diabète de *type 2* sont caractérisés par une hyperglycémie à jeun et par une insulïnémie élevée, normale ou faible selon la sévérité de la maladie. Le diabète de *type 2* apparaît généralement après l'âge adulte moyen, mais son incidence augmente rapidement chez les groupes d'âge plus jeunes.

La prévalence du diabète de *type 2* est croissante partout dans le monde. D'ici l'an 2020, il est prévu qu'environ 250 millions de personnes en seront affectées (140). Au Canada, environ 5% (1,3 millions) de la population canadienne serait atteinte du diabète. En plus des prédispositions génétiques, les facteurs de risque du diabète de *type 2* sont l'obésité, l'inactivité physique et le vieillissement. Selon Santé Canada (1999), 70% des gens atteints du diabète sont inactifs. L'inactivité physique est non seulement un facteur de risque du diabète, mais aussi un facteur de risque de complications comme les maladies cardio-vasculaires. En général, l'entraînement physique favorise la réduction du risque de maladie du cœur chez les diabétiques et améliore plusieurs variables associées aux cardiopathies diabétiques (91). Il a été démontré que l'exercice améliore les performances cardiaques, la captation de glucose et la production d'énergie mitochondriale chez des rats diabétiques (131; 145; 150). Plusieurs facteurs métaboliques et hémodynamiques peuvent contribuer à l'amélioration de l'homéostasie du glucose après des séances d'exercice aigu ou chronique chez des individus atteints du diabète de *type 2*. Il est bien connu que l'exercice chronique diminue la résistance à l'insuline (170) et améliore la tolérance au glucose chez des patients atteints du diabète de *type 2* (163). Il a déjà été démontré que l'entraînement physique augmenterait la sécrétion plasmatique en insuline chez les humains et la concentration d'insuline emmagasinée dans les cellules β du pancréas chez les rats diabétiques de *type 2* (110; 171), ce qui pourrait contribuer à l'amélioration de la glycémie et à la signalisation intracellulaire de l'insuline.

Principaux problèmes cardiovasculaires associés au diabète de *type 2* et à la signalisation de l'insuline.

La dysfonction cardiaque représenterait une complication sévère du diabète de *type 2* (30). Les maladies cardiovasculaires représentent 60-70% de la mortalité chez les personnes atteintes du diabète de *type 2* dans les pays industrialisés (76). Une grande proportion des diabétiques meurent d'ischémie cardiaque (128), ils sont plus susceptibles à des infarctus du myocarde (76) et à la maladie coronarienne (115). Le cœur humain diabétique s'hypertrophie de façon pathologique pour ensuite évoluer vers une dilatation myocardique et des altérations au niveau des propriétés contractiles (67). L'hypertrophie cardiaque est secondaire à un besoin essentiel de répondre à une augmentation de la charge de travail. Pour maintenir une charge élevée de travail, le cœur doit ajuster ses besoins énergétiques. Pour palier à ce phénomène, un cœur en surcharge de travail chronique exprimera des protéines contractiles moins performantes en vitesse de contraction mais plus économiques en consommation d'énergie. Lorsque la machinerie génétique n'est plus en mesure d'exprimer en quantité suffisante les protéines contractiles de type économiques, le cœur n'aurait d'autres choix que d'augmenter l'expression de certaines protéines structurales plus rigides pour supporter la surcharge de pression. D'ailleurs, l'augmentation de la rigidité ventriculaire en diastole est l'une des plus proéminentes déficiences mécaniques associées aux cardiomyopathies diabétiques (161). Cette dysfonction diastolique est caractérisée par une diminution de la compliance et une vitesse plus lente de relaxation ventriculaire (160). Parmi les phénomènes qui pourraient expliquer cette anomalie de la relaxation cardiaque, on

dénote une augmentation du contenu en collagène cardiaque qui serait causée par une augmentation de l'expression du récepteur TGF β II (130), et du gène de la protéine codant pour le collagène de type III (27) et une altération au niveau des courants ioniques K⁺ (173).

La résistance à l'insuline pourrait induire un autre problème très important sur le cœur diabétique, celui du maintien de la synthèse des protéines contractiles. L'insuline favorise un bilan azoté positif (48; 48; 70). L'une des caractéristiques du diabète est la perte de tissu musculaire (72). Une étude récente a démontré que l'ablation spécifique du récepteur à insuline du muscle cardiaque résulterait en une réduction de la grosseur des cardiomyocytes, et en des changements d'isoformes des protéines contractiles et de l'utilisation des substrats cardiaques (15). D'ailleurs, lorsque le niveau d'insuline est faible, le système protéosome-ubiquitine jouerait un rôle important dans la dégradation des protéines (48). L'insuline affecterait plusieurs étapes nécessaires à la synthèse des protéines comme l'initiation de la traduction de l'ARNm (179). L'insuline exerce un contrôle majeur sur l'apoptose dans les cardiomyocytes (4). Entre autres, PKB promulgue la survie cellulaire suite à une ischémie/reperfusion dans des cardiomyocytes *in vitro* (21; 68) et protégerait contre les lésions myocardiques occasionnées par une ischémie/reperfusion (IR) coronaire chez la souris (68). La résistance à l'insuline serait néfaste en terme de protection myocardique diabétique parce que l'insuline signale et régule certaines protéines liées à la survie cellulaire.

La résistance à l'insuline serait possiblement attribuable à une défaillance dans l'une des étapes régulatrices de la signalisation intracellulaire sous le récepteur à

l'insuline. Ainsi, une altération au niveau de la signalisation intracellulaire de l'insuline pourrait avoir des effets similaires à une baisse marquée du niveau d'insuline. Certaines évidences portent à croire que PKB et GSK-3 sont parmi les protéines signalétiques qui sont les plus susceptibles d'être altérées dans le cas de la résistance à l'insuline du cœur diabétique. Les études qui utilisent des souris transgéniques qui n'expriment pas PKB révèlent plusieurs similitudes avec le diabète de *type 2* observé chez les humains, comme l'hyperglycémie, une insulïnémie élevée, et une résistance à l'insuline dans le foie et le muscle (33; 113; 113). De plus, une diminution de l'activité de PKB a été observée dans des cardiomyocytes isolés de rats Zucker (92), dans le myocarde de rats traités à la streptozotocine (STZ) (112), dans le muscle squelettique de différents modèles de rats résistants à l'insuline (85; 108; 165), et dans le vastus lateralis de patients diabétiques de *type 2* (109). Par contre, une étude récente a démontré que le cœur de rats Goto-Kakizaki, un modèle polygénique de diabète de *type 2* spontané, démontrait une diminution de l'expression du récepteur à insuline β , ainsi que de la phosphorylation tyrosine de ce récepteur β (53). De plus, ces mêmes auteurs ont observé une diminution de l'association IRS-1 avec PI3-kinase lorsque stimulé par l'insuline et ce, sans changement au niveau de l'expression de PKB et de phosphorylation de PKB Ser⁴⁷³.

Puisque PKB est couplée à la voie de signalisation de l'insuline, la résistance à l'insuline pourrait faire en sorte de diminuer la protection du cœur diabétique à plusieurs égards. Entre autres, au niveau métabolique, PKB protégerait les cellules cardiaques en promulguant l'entrée du glucose, la régulation de la glycolyse, l'augmentation du couplage glycolyse-oxidation phosphorylante, l'inhibition du PT pore mitochondriale et la phosphorylation et l'inactivation de Bad. Dans le cœur, les principaux transporteurs du

glucose sont le GLUT1 et le GLUT4. Dans le myocarde du rat Zucker, l'expression du GLUT4 est réduite (175), la translocation à la membrane plasmique lorsque stimulée par l'insuline est altérée (199) et le tout serait accompagné d'une diminution de la phosphorylation de PKB (93). De plus, PKB favoriserait la translocation du GLUT4 d'un compartiment intracellulaire à la membrane plasmique dans le cœur de rat et dans des cellules L6 (176; 206).

Il est aussi bien connu que le cœur diabétique accumule du glycogène (32) et une grande accumulation en glycogène est généralement associée au développement de la résistance à l'insuline (96; 102). D'ailleurs, l'action de l'insuline serait diminuée lorsque la concentration en glycogène est élevée (139) et conséquemment, l'activation de PKB serait réduite lorsque le contenu en glycogène est élevé dans le muscle squelettique (52). La relation entre le contenu en glycogène et l'activation de PKB n'a jamais été démontrée dans le cœur. Le fait d'accumuler plus de glycogène n'est pas un problème en soi pour le cœur, ce phénomène serait plutôt protecteur lorsque les besoins en ATP sont impératifs lors d'une ischémie. Le problème se situe plutôt au niveau de l'oxydation du glucose, puisque le taux d'oxydation du glucose et du lactate cardiaque sont significativement réduits chez les animaux diabétiques *in vitro* et *in vivo* (182). Une diminution de l'oxydation du glucose myocardique représenterait un événement pathophysiologique précoce qui pourrait survenir avant des dysfonctions contractiles et des changements pathologiques dans le cœur diabétique de rat (2; 30; 60). L'oxydation des lipides est normalement responsable de 60-90% de l'ATP re-synthétisé dans le cœur et le reste proviendrait de l'oxydation du pyruvate dérivé à partir de la glycolyse et du lactate (182). Lors d'une ischémie, l'oxydation des lipides est réduite et le métabolisme

anaérobie est augmenté suite à la diminution du taux d'oxygène dans le myocarde de rat. La glycolyse et l'oxydation du glucose sont régularisées par des enzymes clés comme la phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate déshydrogénase (PDH). PKB serait l'un des médiateurs de l'augmentation de l'activité de la PFK-2 lorsque le travail contractile est accru (13; 52). L'hypoxie stimule la glycolyse cardiaque en augmentant le transport du glucose et l'activité de l'enzyme PFK-2. L'hypoxie active PKB et GSK-3 dans des cellules PC12 et PKB protège les cellules cardiaques contre l'effet mortel de l'hypoxie en ré-oxygénation (14; 20). Ainsi, une réduction de l'expression, de la phosphorylation et de l'activité de PKB pourrait être néfaste pour le cœur diabétique en période d'ischémie. Le contenu en acides gras libres (AGL) et en citrate est élevé chez des patients résistants à l'insuline (159), ceci inhiberait la glycolyse au niveau de la PFK parce que les AGL sont concurrentiels à l'oxydation du glucose (158; 182). En plus de la PFK, la PDH du cœur diabétique serait aussi altérée lorsque la concentration en AGL augmente. La PDH serait aussi inhibée par une réduction du niveau d'insuline, par la GSK-3 β *in vitro*, et lors d'une augmentation du travail contractile dans le cœur diabétique (90; 104; 182; 207). L'accumulation d'acides gras et de leurs dérivés toxiques a déjà été associée à des altérations mécaniques, à une diminution de l'oxydation du glucose et à des dommages cellulaires dans le cœur de rats diabétiques sujets à de l'ischémie (62; 122; 122; 204). D'ailleurs, la déphosphorylation et l'activité de PKB et de GSK-3 seraient réduites lorsque le palmitate est en excès dans le cœur (177), ce qui pourrait diminuer la protection myocardique. Les mécanismes qui induisent la résistance à l'insuline suite à une infusion de lipides pourraient provenir d'une augmentation des dérivés des AGL (fatty acyl CoA, diacylglycérol, céramides) et de l'augmentation de TNF α (164; 216).

L'augmentation de ces derniers aurait pour conséquence d'activer une cascade sérine/thréonine impliquant la voie PI3-kinase et PKC θ menant à une diminution de l'effet de l'insuline sur le métabolisme des glucides (56; 75).

Effets de l'exercice sur la voie signalétique de PKB/GSK-3 dans le cœur diabétique de *type 2*.

L'effet de l'exercice aigu et chronique sur la régulation de PKB/GSK-3 n'est pas connu dans le cœur diabétique. À partir des recherches sur les effets de l'exercice sur la modulation de PKB/GSK-3 dans le muscle squelettique diabétique, nous tenterons d'établir des liens avec les connaissances actuelles sur le cœur diabétique. Par exemple, l'entraînement physique augmente l'expression du GLUT-4 dans le cœur de rats traités à la STZ (145) et PKB provoquerait la translocation du GLUT-4 d'un compartiment intracellulaire à la membrane plasmique *in vitro* et dans le cœur de rat (78; 176; 206). Le transport du glucose serait augmenté par la contractilité musculaire en absence d'insuline (73). Il a été démontré que l'exercice accroît l'effet de l'insuline sur le transport du glucose chez des souris qui n'ont pas de récepteur à l'insuline et ce, en concomitance à une augmentation de la phosphorylation de PKB dans le muscle squelettique (210). Il a été suggéré que la déplétion en glycogène par l'exercice joue un rôle important sur l'augmentation de l'action de l'insuline (162) et que le contenu en glycogène influencerait le taux de synthèse du glycogène après l'exercice. Une concentration résiduelle élevée en glycogène après l'exercice agirait comme inhibiteur de l'activité de la GS par un mécanisme d'inhibition rétrograde (154), limitant ainsi la synthèse excessive en glycogène. De plus, lorsque le contenu

en glycogène est réduite à moins de 30 mmol/L après l'exercice, la re-synthèse du glycogène serait indépendante de l'insuline, alors qu'en absence d'insuline, la re-synthèse du glycogène cesse lorsque le contenu en glycogène est élevée (155). Il a déjà été démontré que l'entraînement d'intensité modéré réduisait la synthèse du glycogène dans le muscle squelettique de rats diabétiques récupérant d'un exercice prolongé (80). Cette réduction du contenu en glycogène par l'entraînement pourrait être favorable pour le cœur des rats diabétiques, puisque ceux-ci accumulent du glycogène (32) et seraient résistants à l'insuline (205). Ainsi, une diminution du contenu en glycogène par l'entraînement pourrait possiblement améliorer l'activité de PKB et conséquemment la phosphorylation de GSK-3 dans le cœur. D'ailleurs, il a été démontré que l'exercice aigu favoriserait l'augmentation de la phosphorylation de GSK-3 α/β , et ce, en concomitance à une réduction du contenu en glycogène dans le muscle squelettique (125). Par contre, ces derniers auteurs observent que la régulation de la synthèse du glycogène par l'exercice aigu, contrairement à l'effet de l'insuline, n'impliquerait pas l'activation de PKB dans le muscle squelettique de rat (125). À la lumière de ces observations, l'effet de l'exercice chronique sur la régulation de PKB/GSK-3 dans le myocarde insulino-résistant qui accumule du glycogène serait d'intérêt et devrait être investigué.

L'hypertension et les modulateurs de la survie cellulaire

Introduction

L'hypertension artérielle primaire est une élévation anormale et persistante de la pression artérielle. L'assise génétique de la maladie est polygénique et implique au moins

3 gènes majeurs (215). L'hypertension est le facteur de risque et la maladie qui affecte souvent le cœur et les vaisseaux sanguins et elle constitue l'une des principales causes d'insuffisance cardiaque. La prévalence de l'hypertension est fortement corrélée aux défaillances cardiaques mortelles dans les pays industrialisés d'Amérique et d'Europe (211). Selon Statistiques Canada, plus de 3 millions de personnes sont atteintes d'hypertension au Canada. Les facteurs de risque les plus prévalents de l'hypertension sont l'obésité, le tabagisme, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'histoire familiale et l'inactivité physique.

Principaux problèmes cardiovasculaires associés à l'hypertension

Les patients souffrant d'hypertension décèdent souvent des suites de maladies cardiovasculaires. L'hypertrophie pathologique du ventricule gauche présenterait l'une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez l'humain hypertendu (133). L'hypertrophie pathologique ventriculaire est un mécanisme compensatoire qui serait initié en réponse à une surcharge de pression. L'hypertrophie pathologique amène des altérations qualitatives spécifiques en expression génétique et phénotypique. Par exemple, en vieillissant, le cœur des rats spontanément hypertendus (SHR) subit des altérations morphologiques et fonctionnelles telles que : de la rigidité ventriculaire occasionnée par une augmentation de la fibrose (40), des changements d'isoformes contractiles (38), des assauts ischémiques (12) et de l'apoptose (64; 117). La perte de cellules myocardiques par apoptose pourrait faire en sorte d'imposer une charge de travail supplémentaire sur d'autres cellules adjacentes afin de maintenir le travail imposé par l'hypertension.

Effets de l'exercice sur la protection myocardique du cœur hypertendu

Plusieurs effets bénéfiques potentiels de l'exercice sur le cœur hypertendu ont été rapportés; une diminution de la fréquence cardiaque de repos et à l'exercice sous-maximal, une amélioration du taux de relaxation ventriculaire ($-dP/dt$), une amélioration de la protection contre les radicaux libres, une augmentation de la dimension du ventricule en fin de diastole et une amélioration contre les problèmes d'ordres ischémiques {119, 6}. Par contre, les mécanismes et les adaptations cellulaires et moléculaires connus sont peu nombreux. L'entraînement aérobic favorise la réduction de la pression sanguine systolique et diastolique d'environ 11 et 8 mmHg respectivement chez 75% des individus avec l'hypertension (77; 192). Par contre, la majorité des individus qui améliorent leur pression sanguine systolique demeurent quand même hypertendus (77). Entre autres, l'entraînement physique améliore considérablement la performance cardiaque en plus de prévenir une croissance disproportionnée du rapport mitochondries/myofibrilles typique de l'hypertrophie ventriculaire de rat génétiquement hypertendu (42; 42; 66). L'entraînement physique de rats hypertendus favorise le maintien d'un contenu normal en collagène et un meilleur ratio du type de collagène qui favorise la compliance plutôt que la rigidité (III/I). Cette amélioration dans la qualité du collagène serait associée à un meilleur taux de relaxation ventriculaire (24).

Rationnel et objectifs des études

Le point commun entre les cardiomyopathies diabétique et hypertensive réside dans les complications associées aux deux pathologies et menant à l'infarctus du myocarde. En effet, ces deux pathologies sont assujetties à des complications comme l'ischémie, l'hypertrophie et l'apoptose myocardiques. Ainsi, il nous semblait important d'étudier les effets de l'exercice chronique modéré sur l'expression des protéines cardio-protectrices qui sont liées à la fois aux désordres métaboliques et à la survie cellulaire parce que l'entraînement en endurance améliore l'intégrité mitochondriale et métabolique dans le cœur. À notre connaissance, aucune étude n'a été entreprise pour vérifier les effets de l'exercice aigu et chronique sur l'expression des protéines pro et anti-apoptotiques dans le cœur d'animaux diabétiques ou hypertendus entraînés. Aussi, nous avons choisi d'investiguer la régulation de protéines qui sont liées à la fois à la signalisation de l'insuline et à l'apoptose, parce que la résistance à l'insuline et l'apoptose sont présentes dans les deux pathologies étudiées dans cette thèse. Ainsi, l'étude de l'expression et de la phosphorylation de PKB et de l'un de ses substrats, la GSK-3, dans le myocarde de rats diabétiques ou hypertendus sont le point commun des trois études présentées dans cette thèse.

Le diabète de *type 2* : Études 1 et 2

La régulation du métabolisme du cœur diabétique serait consécutive à la sévérité du syndrome. Par exemple, ce syndrome suit une séquence de phases d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie qui évolue dans le temps vers une phase d'hyperglycémie et d'hypoinsulinémie selon la sévérité du diabète de *type 2*. Ces deux phases distinctes du diabète de *type 2* pourraient influencer l'expression et l'activité des protéines associées à la signalisation de l'insuline et à la survie cellulaire. Puisque l'insuline a un pouvoir hypertrophique et promulgue la survie cellulaire, un défaut de signalisation devrait altérer la croissance myocardique et l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques du cœur diabétique. La première étude prévoit vérifier l'hypothèse que la phosphorylation de PKB/GSK-3 est augmentée dans le myocarde au début du développement du diabète de *type 2*, pendant la phase d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie, *in vivo*. Une seconde hypothèse est que la phosphorylation de PKB/GSK-3 est diminuée dans le cœur de rat diabétique de *type 2* lorsque la production d'insuline est inadéquate au maintien d'une glycémie normale. Une troisième hypothèse est que l'entraînement physique améliore la régulation de PKB/GSK-3 lors de la réduction de la sécrétion et du niveau plasmatique de l'insuline. Nous postulons que l'entraînement physique pourrait modifier la concentration plasmatique en insuline et en glycogène et la phosphorylation de PKB/GSK-3.

Peu d'études ont investigué les mécanismes moléculaires liés aux complications cardiaques dans le diabète de *type 2*. Ceci est, en partie, causé par la nature complexe du diabète de *type 2*, et le manque de modèles animaux appropriés.

Le modèle animal de diabète le plus communément utilisé est celui d'une insuffisance en production d'insuline initiée par la destruction rapide des cellules pancréatiques β par la STZ. Ce modèle chimique de diabète serait plutôt un bon modèle pour l'étude du diabète de *type 1*, puisqu'il ne mime pas la progression habituelle du syndrome du diabète de *type 2* observée chez l'humain. Le rat «Zucker Diabetic Fatty» (ZDF/Gmifafa) est un modèle génétique d'obésité spontanée, causée par la mutation du récepteur de la leptine, qui développe une hyperlipidémie et une hyperglycémie plus sévère que le «Zucker obese (fa/fa)» et le Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), en plus de démontrer une forme similaire de complications du diabète de *type 2* à celle retrouvée chez l'humain (34). Au début de la progression de la maladie, la souche ZDF est touchée par une hyperinsulinémie et l'hyperglycémie. Cependant, lors des étapes ultérieures de la maladie, les cellules bêta du pancréas ne répondent plus au taux élevé de glucose, ce qui occasionne une réduction de la sécrétion et du niveau plasmatique de l'insuline (35). Normalement, les rats ZDF démontrent une hyperinsulinémie et une hyperglycémie peu sévère à 6 semaines d'âge et deviennent éventuellement hypoinsulinémiques et hyperglycémiques aux environs de la onzième semaine d'âge. Le rat ZDF serait donc soumis à des altérations métaboliques similaires à celles d'un diabète de *type 2* qui serait mal contrôlé. Jusqu'à maintenant, peu d'études ont été entreprises pour investiguer les complications cardiovasculaires chez le rat ZDF.

L'hypertension : Étude 3

L'amélioration de la protection cardiaque s'avère fort importante dans l'hypertension parce que les patients souffrant d'hypertension décèdent souvent suite à des maladies cardiovasculaires tel que mentionné précédemment. Le rat SHR serait un modèle intéressant pour l'étude de la résistance à l'insuline et de l'hypertension essentielle de gens non-obèses (187) parce que le phénomène de résistance à l'insuline serait existant chez des patients hypertendus non traités et chez le rat SHR (25; 134; 188). Le cœur de rat SHR démontre une hyperactivité des étapes proximales de la signalisation de l'insuline (134), mais à notre connaissance, aucune étude n'a investigué les protéines signalétiques plus en aval, telles que PKB et GSK-3.

La plupart des souches de rats et modèles expérimentaux pour l'étude de l'hypertension et des effets de l'exercice sur l'hypertension sont bien décrits dans la littérature (55; 77; 192). Pour reproduire adéquatement l'évolution de l'hypertension observée chez l'humain, le choix du modèle animal pour l'étude des effets de la maladie sur le cœur doit être systémique et induire une hypertrophie myocardique menant à la décompensation. Le rat SHR est un modèle de rat qui est prédisposé génétiquement à l'hypertension systémique, à l'hypertrophie cardiaque menant à la décompensation, à de l'apoptose et à une haute incidence de maladies cardiovasculaires. Il y a plusieurs avantages à étudier le modèle de rat SHR plutôt qu'un autre modèle expérimental d'hypertension. C'est un modèle chronique stable qui produit des symptômes qui sont prévisibles et similaires à ceux de l'hypertension humaine (55). Normalement, une pression artérielle élevée, de l'ordre de 170 mmHg, est atteinte vers l'âge de 10 semaines pour atteindre éventuellement un plateau à 200 mmHg. Il semble bien accepté dans la

littérature qu'entre 4 et 9 semaines d'âge, le rat SHR est en phase accélérée du développement de l'hypertension et qu'à 13 semaines, il est en phase établie de l'hypertension (59). Le principal problème avec le rat SHR est la méconnaissance de la cause de l'hypertension dans ce modèle. La manifestation de l'hypertension chez le rat SHR est associée à une dyslipidémie et à une résistance à l'insuline du métabolisme des glucides qui est manifestée de façon similaire au syndrome X observé chez l'humain (6). L'hypertension et ses anomalies métaboliques du rat SHR partagent un locus commun sur le chromosome 4. Le dépistage et la cartographie du chromosome 4 du rat SHR ont permis d'identifier un gène défectueux qui est le CD36 ou FAT (fatty acid translocase) (5). Le rat SHR démontre des dysfonctionnements au niveau de la captation et de l'oxydation des acides gras à longue chaîne et une augmentation sévère de la captation du glucose dans le cœur (79). Un autre problème est que le rat SHR développe l'hypertension pendant qu'il est encore un jeune adulte, alors que chez l'humain l'hypertension se développe plutôt à l'âge adulte moyen. Le rat SHR démontre une augmentation fonctionnelle de la résistance vasculaire périphérique, qui dépend en majeure partie d'un mécanisme neurologique qui aurait pour origine un désordre au niveau du système central de la régulation de la pression sanguine.

La plupart des recherches qui ont observé une réduction de la pression sanguine suite à une période d'entraînement ont eu recours à de l'exercice physique d'intensité faible ou modérée (192). Le programme d'entraînement à la course utilisé ici sera d'intensité modéré et d'une durée prolongée. Un entraînement de longue durée a été choisi pour son effet potentiel à réduire le contenu en glycogène dans le cœur. L'entraînement sera débuté pendant la phase accélérée du développement de

l'hypertension, parce que l'augmentation significative de l'apoptose chez le rat SHR serait dépendante de l'âge, débutant vers quatre semaines, juste avant que la pression sanguine commence à augmenter de façon significative (118). Cette étude prévoit vérifier que la pression sanguine artérielle et les fonctions cardiaques seront améliorées par l'entraînement au début de la phase accélérée du développement de l'hypertension chez le rat SHR. Une seconde hypothèse est que l'entraînement de longue durée diminuera le contenu en glycogène et améliorera la phosphorylation de PKB/GSK-3 dans le myocarde des rats SHR. Une troisième hypothèse est que l'entraînement favorisera l'expression des protéines liées à la survie cellulaire (Bcl-2 et HSP-72) et diminuera l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax. Plus spécifiquement, l'exercice pourrait améliorer la probabilité de survie cellulaire, en augmentant le ratio entre l'expression des protéines Bcl-2 et Bax, qui semble être diminuée dans le cœur des rats SHR (64). Nous avons aussi choisi de vérifier l'expression de la protéine HSP-72 parce qu'elle protégerait les cellules myocardiques contre l'apoptose et la sur-expression de Bax et aussi parce que GSK-3 participe à la régulation de la transcription de HSP-72 (136; 186). Cette forme de cardio-protection promulguée par l'exercice (120) n'a jamais été démontrée dans des cœurs hypertendus.

Chapitre 2

Manuscrit 1

Titre

PKB/GSK-3 phosphorylation and BCl-2/Bax ratio in the heart of Zucker diabetic fatty rat with early and late onset of hyperglycemia.

Auteurs

Claude Lajoie, Angelino Calderone, François Trudeau, Guy Massicotte, Sylvain Gagnon, Nathalie Lavoie et Louise Béliveau

Journal

En préparation pour Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Title: PKB/GSK-3 phosphorylation and Bcl-2/Bax ratio in the heart of Zucker diabetic fatty rat with early and late onset of hyperglycemia.

Authors: Claude Lajoie^{1,3,7}, Angelino Calderone^{2,3,4}, François Trudeau⁵, Nathalie Lavoie^{5,6}, Guy Massicotte^{5,6}, Sylvain Gagnon⁵ and Louise Béliveau^{1,3}.

Affiliation: Department of Kinesiology¹, Department of Physiology², and GRSNA (Groupe de recherche sur le système nerveux autonome)³, University of Montreal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montreal, H3C 3J7; Montreal Heart Institute⁴, 5000 Bélanger est, Montreal, H1T 1C8; and Neuroscience Research Group of the University of Quebec in Trois-Rivières⁵, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières⁶, G9A 5H7, Quebec ; Department of Human Kinetics⁷, Laurentian University, Ramsey Lake Road, P3E 2C6, Ontario, Canada

Address for correspondence and proofs;

Dr. Louise Béliveau

Département de kinésiologie

Université de Montréal

CP 6128, Succ. Centre-ville

Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

Telephone: (514) 343-6083

Fax: (514) 343-2181

Email: XXXXXXXXXX

Running head: PKB/GSK-3 regulation in the ZDF heart

Sommaire traduit

La résistance à l'insuline et l'accumulation de glycogène cardiaques sont des caractéristiques connues du diabète de *type 2*. Par contre, les mécanismes demeurent largement inexpliqués. L'hypothèse de la présente étude est que la protéine kinase B (PKB) et la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3), deux enzymes impliquées dans l'homéostasie du glucose, la croissance cellulaire et l'apoptose sont altérées dans le myocarde de rat Zucker diabetic fatty (ZDF). Nous avons aussi examiné le ratio Bcl-2/Bax, un important marqueur de la probabilité de survie cellulaire du myocarde. Les animaux ZDF ont été séparés en deux groupes, le groupe des hâtifs et des tardifs, en relation à l'initiation de l'hyperglycémie. Aussitôt que 6 semaines après le début de l'hyperglycémie, nous avons observé une diminution significative du ratio poids du cœur sur le poids du corps chez les rats ZDF. De plus, le poids du cœur n'a pas augmenté significativement avec le temps. Ceci est survenu malgré une augmentation drastique de la phosphorylation de PKB Thr³⁰⁸, de GSK-3 α/β et de l'insulinémie. Dans le groupe des hâtifs, la phosphorylation de PKB était différemment régularisée, la phosphorylation de PKB Ser⁴⁷³ était diminuée alors que celle de PKB Thr³⁰⁸ et GSK-3 α/β étaient augmentées. L'élévation rapide de la glycémie et du contenu en glycogène pourraient expliquer, du moins en partie, la régulation indépendante des résidus de PKB dans ce groupe. Les altérations au niveau de la phosphorylation de PKB et la réduction du ratio pro-survie Bcl-2/Bax lorsque l'hyperglycémie est induite rapidement pourraient exposer le cœur diabétique à de l'apoptose.

Summary

In order to verify the effect of a rapid exposure to high level of plasma glucose on the heart, early and late hyperglycemia onset Zucker diabetic fatty (ZDF) rat were compared. The hypothesis tested was that protein kinase B (PKB) and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), both insulin signaling enzymes implicated in glucose homeostasis, cell growth and apoptosis may be impaired in the heart of ZDF rats especially in the early onset hyperglycemia. The Bcl-2/Bax ratio, an important marker of myocardial cell survival probability was also examined. In the early onset group, the phosphorylation of PKB was regulated differentially, with a decreased PKB Ser⁴⁷³ (-64%) and increased PKB Thr³⁰⁸ (170%) phosphorylation despite drastic increases in insulinemia. In the late onset, PKB Thr³⁰⁸ phosphorylation was also increased (80%), but PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation was not reduced significantly. Phosphorylation of GSK-3 α and GSK-3 β was significantly elevated by 60% and 334% respectively in the early ZDF group as compared to controls, whereas both isoforms were similar to their respective control in ZDF late. The Bcl-2/Bax pro-survival ratio was reduced and maintained in the early and late onset group respectively. In conclusion, this study suggests that in the early setting of *type 2* diabetes, the heart is subject to several impairments related to proteins involved in the insulin signaling pathway and apoptosis.

Introduction

Type 2 diabetes is a prevalent cause of morbidity and mortality, mainly due to cardiovascular complications (48). Changes in cardiac metabolism are among the earliest diabetes-induced alterations in the myocardium, appearing shortly after the development of hyperglycemia and preceding change in cardiac function (7). Hyperglycemia seems to worsen the prognosis of myocardial infarction in diabetic patients (6). Hyperglycemia has been shown to induce myocardial apoptosis in the mouse (5) and *in vitro* (15). The incidence of apoptosis increases in the heart of subjects with diabetes (17), in mice (24) and in rats (14). An important indicator of apoptosis in the cardiomyocyte is the ratio between bcl-2, an anti-apoptotic protein, and Bax, a pro-apoptotic protein (31; 39). The ratio of BCL-2/ Bax protein expression was shown to be decreased in the presence of hyperglycemia and myocyte apoptosis *in vitro* (15). The deleterious effect of elevated glucose and exaggerated amounts of glycogen seen in the diabetic heart (8) could be deleterious for the heart, because anti-apoptotic protein involved in the insulin signaling pathway, like protein kinase B (PKB), has been shown to be negatively regulated by elevated muscle glycogen content in skeletal muscle (13; 26; 36). PKB play a key role in cardiac metabolism and gene expression because it mediates many of the metabolic actions of insulin and various signaling events; protein synthesis, carbohydrate metabolism, cell cycle, transcription and apoptosis. Transgenic studies have shown that mice lacking PKB expression displayed many features of *type 2* diabetes observed in humans, namely hyperglycemia, hyperinsulinemia, and insulin resistance (9; 30). The elevated insulin content in the early setting of *type 2* diabetes may not protect the heart, because cardiac insulin resistance is also a characteristic of *type 2* diabetes. Insulin has been shown to protects cardiomyocytes from apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K pathway) (1). PKB is also a direct downstream effector of PI3-kinase (for review see

(25)). PKB is biologically active following the dual phosphorylation of the threonine³⁰⁸ and the serine⁴⁷³ residue, both of which are critical to achieve a high level of PKB activity (2). PKB mediates phosphorylation and the following deactivation of GSK-3, a ubiquitously expressed serine/threonine kinase with two related isoforms, GSK-3 α and GSK-3 β , which are activated by insulin (11; 53). Decreased activity of GSK-3 promotes cardiac hypertrophy and glycogen synthesis (11; 19), whereas increased activity is proapoptotic and suppresses cardiac hypertrophy *in vivo* (3; 41).

To date, few studies have looked at cardiac insulin signaling and apoptosis in genetic animal models of *type 2* diabetes *in vivo*. In order to investigate this, we chose an insulin-resistant animal model, the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat, which genetically manifests numerous characteristics of *type 2* diabetes similar to those observed in humans (10). In the ZDF rat, the early progression of the disease is associated with progressive hyperglycemia and elevated plasma insulin levels. We hypothesize that the PKB and GSK-3 α and GSK-3 β phosphorylation and the protein expression of two of the best-known proteins involved in the early steps of apoptosis, Bax and Bcl-2 are impaired in the ZDF heart.

Methods

Experimental procedures

All protocols were approved by the Animal Care Committee of University of Quebec in Trois-Rivières and followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, 1985). Ten male Zucker diabetic fatty (ZDF) rats and ten of their lean wild type controls were studied. ZDF rats were obtained from Genetic Models (Gmi™, Indianapolis, IN). Animals were 6 weeks old at reception. A standard rat diet was used and the animals were fed *ad libitum*. The light/dark cycle was 12h/12h.

Glycemia was measured each week with a glucometer (Bayer, Toronto, Canada), using blood sampled from the tail. Hyperglycemia was defined as glycemia higher than 15 mM of glucose and animals were sacrificed 6 weeks after they reached this level along with a control animal. They were anesthetized with isoflurane (Janssen, Toronto, Canada) and sacrificed by decapitation. Blood samples were collected from the neck into heparinized glass test tubes for measurements of plasma glucose by enzymatic assay (Glucose oxydase kit; Sigma, Oakville, Canada) and insulin by radioimmunoassay (Linco Research, St-Charles, MO). The heart was rapidly excised and the atria and both ventricles were weighed and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until tissue analysis. Glycogen concentration in the left ventricle was determined spectrophotometrically using sulfuric acids (32). Other measurements included PKB Thr³⁰⁸, PKB Ser⁴⁷³ and GSK-3 α/β phosphorylation as well as protein expression of PKB, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), ILK (Integrin Link Kinase), Bax and Bcl-2.

Homogenization and sample preparation

The left ventricle was pulverized in a mortar cooled with liquid nitrogen, and subsequently transferred to a lysis buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.4, 1% triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, protease inhibitors (0.5 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin), phosphatase inhibitors (100 µM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride) and re-homogenized. Lysates were subsequently centrifuged at 12 000 g, 4°C, for 10 min to remove insoluble material. The supernatant was removed, and protein content was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Analysis of proteins by Western blotting

100-200 µg of total protein was loaded onto a 10 to 15 % acrylamide gel and separated overnight at 4°C. The samples were simultaneously electrotransferred to polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) and visualized by Ponceau S staining to confirm successful transfer and equal sample loading. Membranes were blocked with 5% BSA (PKB and GSK-3) or 5% skim milk (Bax, Bcl-2, ILK and PCNA) in Tris-buffered saline + Tween 20 (TBST; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.1 % Tween 20). All washes were done in TBST. Antibodies against pPKB Thr³⁰⁸, pPKB Ser⁴⁷³ and pGSK-3α/β (New England Biolab), ILK (Stressgen, Victoria, BC), Bax, Bcl-2, PKB protein and PCNA (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, California), were prepared at a concentration of 1:1000, except for Bax (1:200) and Bcl-2 (1:500) in either TBST plus 3 % BSA (pPKB and pGSK-3) or 5 % skim milk (Bax, Bcl-2, ILK, PKB and PCNA). Following incubation, the membranes were washed with TBST, subjected to the appropriate secondary antibody (conjugated to horse radish peroxidase) for 1-2 hrs at room temperature, and the bands subsequently detected by autoradiography with the ECL detection kit (Amersham Ltd,

Piscataway, NJ). Films were quantified using a flatbed scanner and Scion image (Scion Corp., Frederick, MD).

Statistics

Data are expressed as mean of the arbitrary optical density in units or percent change from controls \pm SEM. Correlations were assessed by a Pearson product-moment test. Data were analyzed by a one-way ANOVA followed by Newman Keuls post-hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Insulin, glucose and glycogen concentration

Five of the ZDF rats exhibited hyperglycemia after 3 weeks and then proceeded to become more hyperglycemic until sacrifice 6 weeks later (14,5 weeks old). Four ZDF rats developed hyperglycemia at a much slower rate, beginning 3 to 4 weeks later and one ZDF rat failed to develop hyperglycemia. Consequently one animal was discarded and the other ZDF animals were split in two distinct groups referred to as the early and late onset of hyperglycemia (Figure 1). Control animals maintained a constant glycemia that was significantly different from that of both ZDF groups from week 3 until sacrifice. At the time of sacrifice, glycemia, measured by an enzymatic assay, was not significantly different between early and late ZDF but differed from respective controls (Table 1). Plasma insulin of ZDF groups was significantly higher compared to their respective controls ($p < 0,001$). Hence, ZDF animals were all hyperinsulinemic and hyperglycemic. Moreover, plasma insulin concentration was significantly higher and more variable in late than in early ZDF (Table 1). The glycogen content in the left ventricle of early and late ZDF was almost three times more elevated than in early and late controls (Table 1).

Morphologic data

Body weight of ZDF groups was higher than that of their respective lean controls. Body weight of early ZDF rats was significantly lower ($p < 0,001$) than that of late ZDF animals, which is not surprising since the latter were 3 weeks older (Table 2). There was no statistical difference between ZDF and their respective controls in heart weight. However, heart weight of late controls was significantly higher than that of early controls (Table 2). Left ventricle (LV) of ZDF was not different than that of the lean control groups, but a trend was noted ($p = 0,07$) for a higher mass in early ZDF (Table 2). HW/BW ratio was significantly

lower for late and early ZDF compared to late and early controls, mainly due to higher body weight (Table 2). We also observed that the atrial mass was significantly elevated in early ZDF as compared to control.

PKB phosphorylation

Phosphorylation of PKB Thr³⁰⁸ was markedly increased in early (170%) and in late ZDF (80%) as compared to controls (Figure 2). Phosphorylation of PKB Ser⁴⁷³ on the contrary was significantly decreased (-64%) in early ZDF as compared to controls (Fig. 2) and a similar tendency was observed in late ZDF (-32%) (Fig. 2). Total PKB protein expression was almost identical between early ZDF and controls, but late ZDF had a significantly lower PKB protein expression (-43%), then late controls (Fig. 2).

GSK-3 phosphorylation

Phosphorylation of GSK-3 α and GSK-3 β was significantly elevated by 60% and 334% respectively in the early ZDF group as compared to controls, whereas both isoforms were similar to their respective control in ZDF late (Fig. 3). Phosphorylation of GSK-3 α and of GSK-3 β were both correlated ($r = 0,69$ and $r = 0,74$; $p < 0,05$) with phosphorylation of PKB Thr³⁰⁸.

Bax and Bcl-2 protein expression

Bax protein expression was variable but significantly enhanced by 30% ($\pm 0,11$; $p < 0,05$) in early ZDF, whereas Bcl-2 protein expression was not significantly changed (-23% ($\pm 0,13$; $p = 0,08$)) (Fig. 6). Bcl-2/Bax ratio was significantly decreased by 46% ($\pm 0,09$; $p < 0,05$) in early ZDF. In late ZDF, by contrast, Bax protein expression was not

significantly enhanced 9% ($\pm 0,09$; $p>0,05$), Bcl-2 was enhanced by 53% ($\pm 0,04$; $p<0,05$) and the Bcl-2/Bax ratio was significantly increased by 44% ($\pm 0,18$; $p<0,05$).

Discussion

In this study, we observed that ZDF rats developed hyperglycemia at different time courses, which has also been shown elsewhere in the ZDF animal (47). This discrepancy may be due to the strain, the uptake of food and to the integrity of the pancreas. One of the main findings is that in animals with a faster onset of hyperglycemia, the stress appears more severe than in animals with a more delayed onset, as suggested by changes in proteins involved in initial apoptotic signal. Myocyte apoptosis induced by high glucose concentration have been observed in streptozotocin (STZ) rats at earlier than at later time (14; 24). The ratio between myocardial Bcl-2 and Bax protein expression has been proposed as an important marker for cell survival probability (39). In the early ZDF heart, Bax protein expression was enhanced and Bcl-2 protein expression was maintained, which decreased the Bcl-2/Bax ratio. In the present study, in contrast to early ZDF rats, Bax protein expression was unchanged in late ZDF, Bcl-2 was enhanced, and the Bcl-2/Bax ratio was maintained. Hence, it is possible that a more gradual increase in glycemia, as seen in the late ZDF, allowed for a response to the increase in Bax protein by an increased expression of Bcl-2 protein, to counteract an apoptotic stimulus in the heart. PKB activity in the ZDF animals of the present study was probably compromised, because PKB is normally biologically active following the dual phosphorylation of the threonine³⁰⁸ and the serine⁴⁷³ residue, both of which are critical to achieve a high level of activity (2). This could be deleterious to the ZDF heart because PKB seem to play a key role in cardiac metabolism, protein synthesis, cell cycle and apoptosis. However, this should be interpreted with caution as it has been shown that PKB phosphorylation and activity are not necessarily matched, in insulin stimulated muscle (50).

We observed that PKB Thr³⁰⁸ was highly phosphorylated and Ser⁴⁷³ was less phosphorylated in early ZDF. A similar finding of uncoupling of PKB phosphorylation on Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ has been reported in streptozocin-treated (STZ) rat hearts (29) and PKB deactivation has been observed in the myocardium of obese non-diabetic Zucker rat (21), but this had never been investigated in the myocardium of an animal model of *type 2* diabetes. The reduced phosphorylation of Ser⁴⁷³ could be an early signaling defect in *type 2* diabetes. Indeed, we have shown that in older ZDF rats, with more severe sign of diabetes, both PKB residues are dephosphorylate (in press (28)). The independent regulation of PKB residues could be the result of various stimuli and signaling mechanisms (33; 43; 45). Hyperglycemia could be an important mechanism by which PKB Ser⁴⁷³ is less phosphorylated and independently regulated, because PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation is reduced in skeletal muscles incubated in a medium containing a high glucose concentration (25 mM) (37), similar to that measured in ZDF rats in this study. The opposite is also true, hypoglycemia increased PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation in brain cortex (40) and normalized glucose restored insulin-stimulated PKB kinase activity (27; 38). In this study, we also observed a small but significant inverse correlation between glycemia and PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation ($r = -0.5$, $p < 0.05$). Moreover, the level of hyperglycemia in the late ZDF was lower over the time course of this study (figure 1) and this could explain why the basal PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation was higher. Interestingly, Laviola and al.(29) observed in STZ rat heart that insulin infusion restored PKB Ser⁴⁷³, whereas in this study PKB Ser⁴⁷³ was less phosphorylated in the presence of hyperinsulinemia. Hence, an upstream signaling defect or an inhibitory mechanism may have overridden the effect of insulin on PKB Ser⁴⁷³ in the myocardium of early ZDF. Moreover, PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation was probably also impair in the late ZDF, because plasma insulin level was significantly more elevated than in the early ZDF and all controls.

Glycogen content was highly elevated in ZDF rats and PKB activation has been shown to be negatively regulated by elevated muscle glycogen content in skeletal muscle (13; 26; 36). An interesting concept would be that PKB may act as a metabolic switch to prevent over-accumulation of glycogen into the diabetic myocardium by reducing glucose transport. Large increases in muscle glycogen are generally associated with development of insulin resistance (23; 26) and it is also well known that the diabetic heart accumulates exaggerated amounts of glycogen (8). There is strong support for PKB participation in the stimulation of GLUT 4 translocation in muscle cells, for instance when PKB was mutated and inactivated, insulin could not stimulate GLUT 4 translocation *in vitro* (51). Targeted disruption of GLUT 4 in muscle selectively causes insulin resistance (54). Myocardial GLUT4 protein expression is decreased in the ZDF (47) and PKB activation and GLUT4 recruitment are altered in the heart of Zucker rats (22). The increase in heart glycogen content despite a reduced action of cardiac GLUT4 protein could be explained by the mass action effect of hyperglycemia to increase GLUT1 mediated glucose uptake (49).

Hyperinsulinemia did not induce cardiac hypertrophy, despite the fact that the myocardium is heavier in normal rats with hyperinsulinemia (20). The ZDF rat has been characterized by a marked hypertrophy of single cardiomyocytes without a significant increase in total heart weight, but treatment with insulin led to a significant increase in heart weight and body weight (16). The lowest PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation in early ZDF and the reduced PKB protein expression in late ZDF, might have otherwise weakened the stimulus for heart growth, by reducing PKB activation of mTOR/FRAP or effectors of mTOR/FRAP, namely 4E-BP1 and p70^{S6K} (46). Normally, insulin promotes PKB/GSK-3 phosphorylation and protein synthesis, and inhibits protein degradation (18; 35; 52). It has been demonstrated that phosphorylation and inactivation of GSK-3 is essential for the

hypertrophic response of cardiomyocytes *in vitro* and *in vivo* (19). We did not observe cardiac hypertrophy despite an increase in GSK-3 phosphorylation in the early ZDF. GSK-3 phosphorylation has been previously shown to be reduced in STZ diabetic heart following insulin stimulation (29), but heart weight was not measured and this animal model of *type 1* diabetes is difficult to compare to the ZDF rat model of *type 2* diabetes. Additionally, the ratio of HW/BW was significantly reduced in both ZDF groups, a situation in accordance with other results in a similar rat model or in cardiac insulin receptor-knockout mouse (4; 22; 44; 47), but not in STZ-induced diabetes (42) and Otsuka long-Evans Tokushima Fatty rats (34). The lower HW/BW ratio in ZDF rats was probably due to the obese state, but normally, heart size is increased in overweight subjects and during normal postnatal development there is a linear relationship between the increase in body weight and heart weight (12). Hence, insulin signaling could have been disturbed in the early ZDF heart and the decrease in PKB phosphorylation could have blunted the signal require for increasing heart mass, despite an increase in GSK-3 phosphorylation. Laviola and al. (29) reported a similar observation in STZ rat heart, where PKB phosphorylation on Thr³⁰⁸ increased five folds and the increased activity of proximal-signaling proteins, IRS-2 and PI 3-kinase was not propagated distally to GSK-3. Additionally, we observed that both GSK-3 isoforms were not significantly phosphorylated in late ZDF, despite the increase in PKB Thr³⁰⁸ phosphorylation and hyperinsulinemia suggesting that the signal was not propagated to GSK-3.

In conclusion, we investigated the status of several important molecules related to insulin signaling and cell survival in the heart of ZDF rats *in vivo*. We found that in animals with a rapid, rather than a more delayed onset of hyperglycemia, a strong PKB Thr³⁰⁸ and GSK-3 α/β phosphorylation along with a decrease in PKB Ser⁴⁷³

phosphorylation and a pro-apoptotic state were present. Animals with a more delayed onset of hyperglycemia had altered protein expression of PKB. Moreover, a more delayed onset may have protected against apoptosis by allowing for a normal Bcl-2/Bax ratio by a mechanism that increased the protein expression of Bcl-2. We also observed that the heart did not grow in parallel with the body in spite of elevated plasma insulin content and high PKB Thr³⁰⁸ and GSK-3 phosphorylation in the ZDF heart.

Table 1

Insulin, glucose and glycogen concentration

	Early ZDF	Control	Late ZDF	Control
Plasma glucose (mM)	39.2 ± 0.9*	9.04 ± 0.7	40.03 ± 6.6*	7.08 ± 2.2
Plasma insulin (ng/ml)	3.01 ± 0.3*†	1.28 ± 0.2	4.86 ± 1.3*	0.99 ± 0.3
Glycogen (µg/mg tissue)	2.95 ± 0.16*	1.06 ± 0.11	3.04 ± 0.21*	0.63 ± 0.11

* significantly different from controls . $p < 0.01$

† significantly different from late ZDF. $p < 0.01$

Table 2

Morphologic data

	Early		Late	
	ZDF	Controls	ZDF	Controls
Body weight (g)	379 ± 27*‡	303 ± 21 †	457 ± 18*	344.5 ± 23
Heart (g)	1.15 ± 0.10	1.05 ± 0.05 †	1.27 ± 0.04	1.29 ± 0.21
HW/BW (mg/g)	3.05 ± 0.03*	3.47 ± 0.01	2.79 ± 0.08*	3.70 ± 0.45
LV (g)	0.88 ± 0.06	0.76 ± 0.05 †	0.93 ± 0.03	0.95 ± 0.17
LV/BW (mg/g)	2.32 ± 0.19	2.52 ± 0.15	2.05 ± 0.12*	2.76 ± 0.35
Atria (mg)	56 ± 4*	41 ± 4 †	68 ± 1	65 ± 18

* significantly different from respective controls, $p < 0.05$

† significantly different from late controls, $p < 0.05$

‡ significantly different from late ZDF, $p < 0.05$

Figure legends

Fig 1: Glucose concentration over weeks in early and late ZDF and respective control (Ctl). * $p < 0.05$ ZDF early vs ZDF late. (n = 4-5/group). Results are average \pm SEM.

Fig 2: Effect of diabetes on PKB phosphorylation in ZDF and respective controls (Ctl). A: Western blots of PKB Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ phosphorylation and PKB total protein expression. B: Each bar represents the mean \pm SEM fold increase from control levels (n = 4-5/group). * $p < 0.05$ ZDF vs controls.

Fig 3: Effect of diabetes on GSK-3 α/β phosphorylation in ZDF rats and respective controls (Ctl). A: Western blots of GSK-3 α and β isoforms in ZDF early/late and respective controls rats. B : Each bar represents mean average \pm SEM arbitrary scanning units (n = 4-5/group).* $p < 0.05$ between ZDF vs controls.

Fig 4: Effect of diabetes on Bax and Bcl-2 protein expression in ZDF and respective controls (Ctl). A: Western blots of Bax and Bcl-2 expression between ZDF and respective controls. B: Each bar represents mean \pm SEM arbitrary scanning units (n = 4-5/group).* $p < 0.05$ ZDF vs controls.

Figure 1

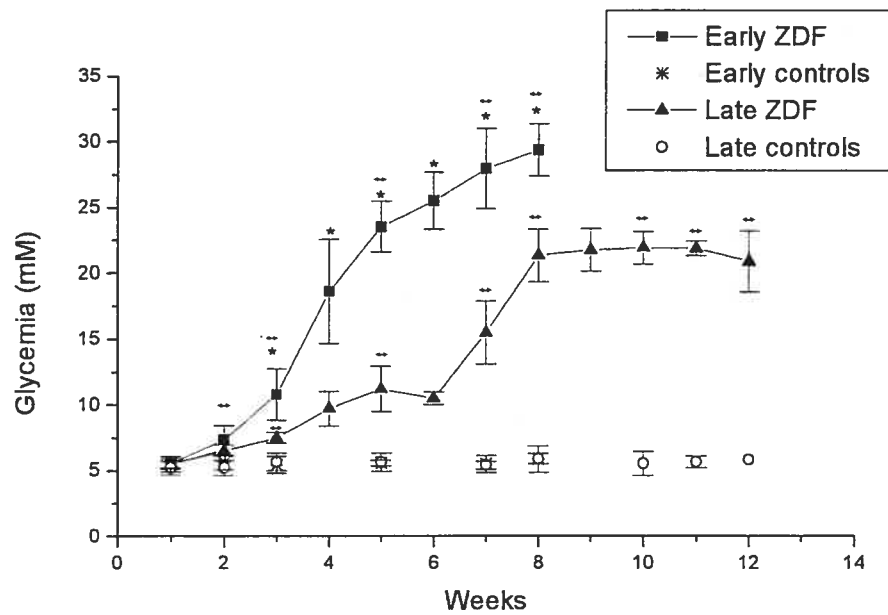


Figure 2

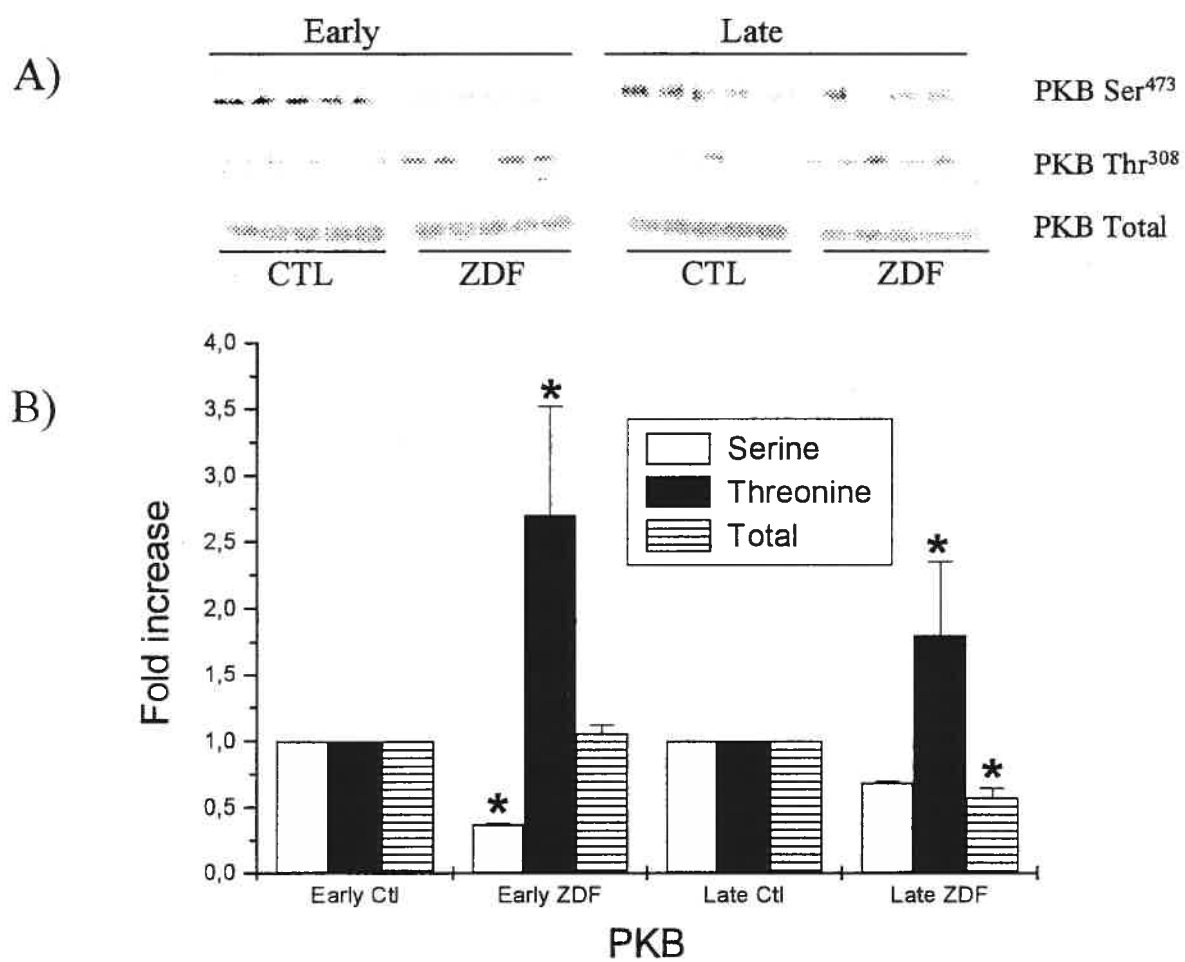


Figure 3

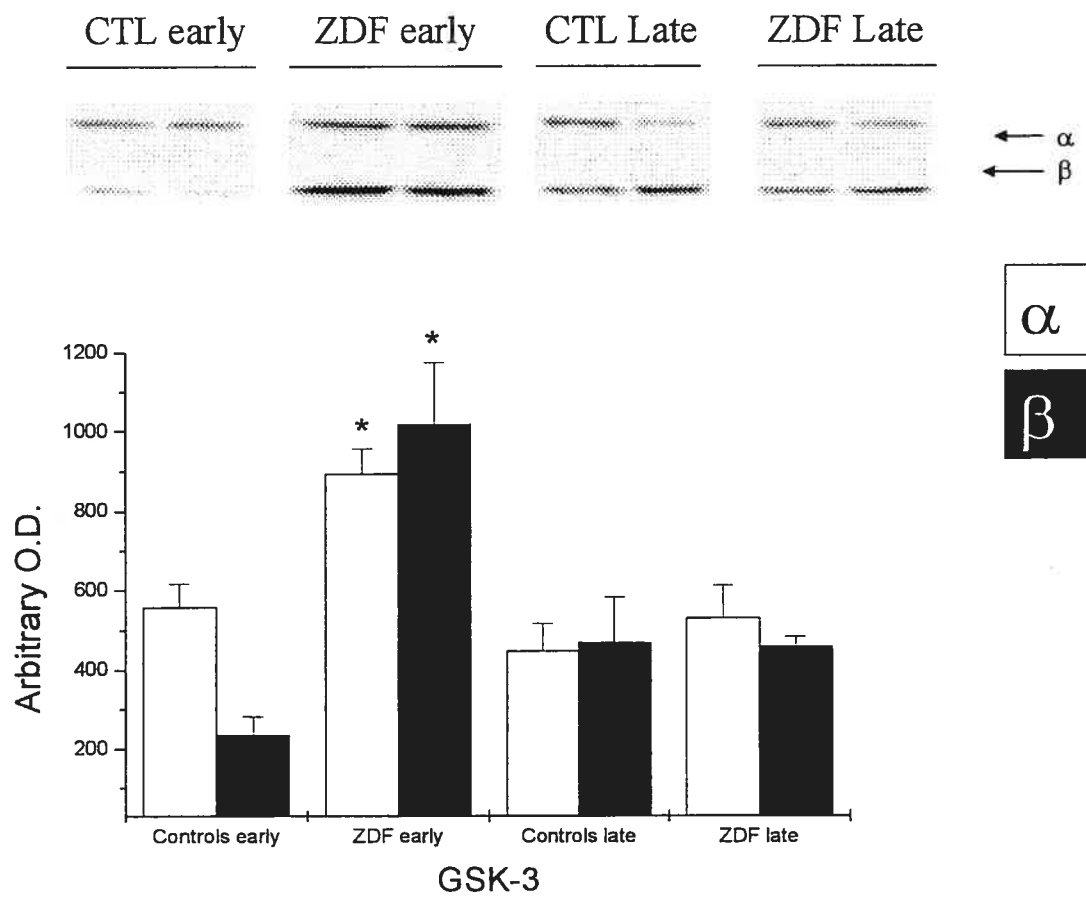
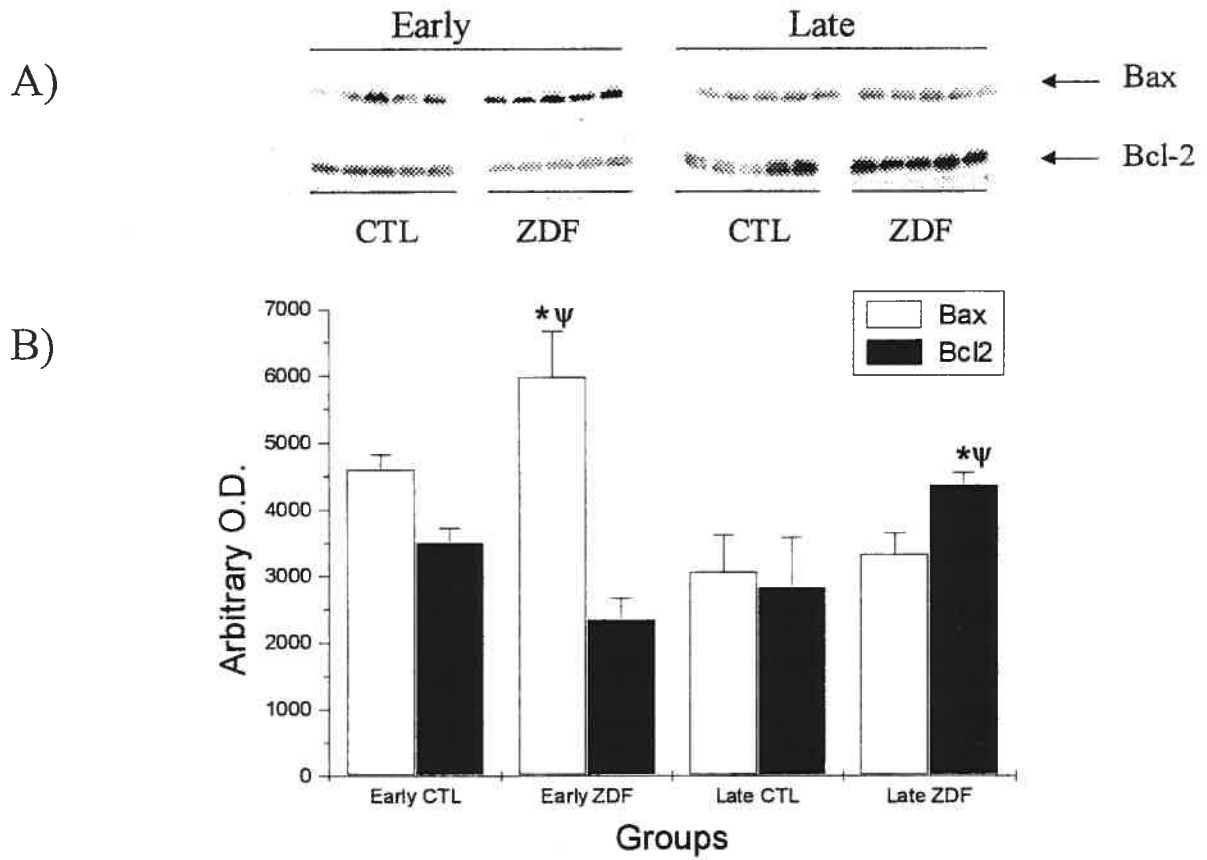


Figure 4



Reference List

1. **Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T, Zhu W, Nagai R and Komuro I.** Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 102: 2873-2879, 2000.
2. **Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO Journal* 15: 6541-6551, 1996.
3. **Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, Richardson JA, Hill JA and Olson EN.** Activated glycogen synthase-3beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 99: 907-912, 2002.
4. **Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeier H, Severson D, Kahn CR and Abel ED.** Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 109: 629-639, 2002.
5. **Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y and Kang YJ.** Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Mouse Myocardium: Mitochondrial Cytochrome c-Mediated Caspase-3 Activation Pathway. *Diabetes* 51: 1938-1948, 2002.

6. **Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P and Gerstein HC.** Stress Hyperglycemia and Prognosis of Stroke in Nondiabetic and Diabetic Patients: A Systematic Overview. *Stroke* 32: 2426-2432, 2001.
7. **Chatam, J. C., Forder, J. R., and McNeil, J. H.** The heart in diabetes. (Editors). 1996. Norwell, MA, Kluwer Academic.
8. **Chen V and Ianuzzo CD.** Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Can J Physiol Pharmacol* 60: 1251-1256, 1982.
9. **Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw III EB, Kaestner KH, Bartolemei MS, Shulman GI and Birnbaum MJ.** Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 292: 1728-1731, 2001.
10. **Clark JB, Palmer CJ and Shaw WN.** The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 173: 68-75, 1983.
11. **Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M and Hemmings BA.** Inhibition of glycogen synthase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789, 1995.

12. **de Simone G, Daniels SR, Devereux RB, Meyer RA, Roman MJ, de Divitiis O and Alderman MH.** Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults: assessment of allometric relations and impact of overweight. *J Am Coll Cardiol* 20: 1251-1260, 1992.
13. **Derave W, Hansen BF, Lund S, Kristiansen S and Richter EA.** Muscle glycogen content affects insulin-stimulated glucose transport and protein kinase B activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E947-E955, 2000.
14. **Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A and Kajstura J.** Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II- dependent. *Lab Invest* 80: 513-527, 2000.
15. **Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P and Kajstura J.** Hyperglycemia Activates p53 and p53-Regulated Genes Leading to Myocyte Cell Death. *Diabetes* 50: 2363-2375, 2001.
16. **Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GAJ, Kromer EP and Weil J.** Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovascular Pathology* 13: 11-19, 2004.
17. **Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B and Anversa P.** Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 87: 1123-1132, 2000.

18. **Goldberg AL.** Influence of insulin and contractile activity on muscle size and protein balance. *Diabetes* 28: 18-24, 1979.
19. **Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A, Molkentin JD, Alessandrini A, Woodgett JR, Hajjar RJ, Michael A and Force T.** Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 151: 117-129, 2001.
20. **Holmang A, Yoshida N, Jennische E, Waldenstrom A and Bjorntorp P.** The effects of hyperinsulinaemia on myocardial mass, blood pressure regulation and central haemodynamics in rats. *Eur J Clin Invest* 26: 973-978, 1996.
21. **Huisamen B, Donthi RV and Lochner A.** Insulin in combination with vanadate stimulates glucose transport in isolated cardiomyocytes from obese Zucker rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 15: 445-452, 2001.
22. **Huisamen B, van Zyl M, Keyser A and Lochner A.** The effects of insulin and beta-adrenergic stimulation on glucose transport, glut4 and PKB activation in the myocardium of lean and obese non-insulin dependent diabetes mellitus rats. *Mol Cell Biochem* 223: 15-25, 2001.
23. **Jensen J, Aslesen R, Ivy JL and Brors O.** Role of glycogen concentration and epinephrine on glucose uptake in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol* 272: E649-E655, 1997.

24. **Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli AM, Li B, Chimenti S, Medow MS, Limana F, Nadal-Ginard B, Leri A and Anversa P.** IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. *Diabetes* 50: 1414-1424, 2001.
25. **Kandel ES and Hay N.** The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Research* 253: 210-229, 1999.
26. **Kawanaka K, Nolte LA, Han DH, Hansen PA and Holloszy JO.** Mechanisms underlying impaired GLUT-4 translocation in glycogen- supercompensated muscles of exercised rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1311-E1318, 2000.
27. **Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H and Zierath JR.** Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes* 46: 2110-2114, 1997.
28. **Lajoie, C., Trudeau, F., Lavoie, N., Massicotte, G., Gagnon, S., Calderone, A., and Béliveau, L.** Exercise training attenuated the PKB and GSK-3 dephosphorylation in the myocardium of ZDF rats. *J. Appl. Physiol.* (in press). 2003

29. **Laviola L, Belsanti G, Davalli AM, Napoli R, Perrini S, Weir GC, Giorgino R and Giorgino F.** Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. *Diabetes* 50: 2709-2720, 2001.
30. **Lawlor MA and Alessi DR.** PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Science* 114: 2903-2910, 2001.
31. **Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J and Anversa P.** Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the BCL-2 to Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* 101: 1326-1342, 1998.
32. **Lo S, Russell JC and Taylor AW.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236, 1970.
33. **Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA and Hiles ID.** Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene* 18: 8024-8032, 1999.
34. **Mizushige K, Yao L, Noma T, Kiyomoto H, Yu Y, Hosomi N, Ohmori K and Matsuo H.** Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a *type II* diabetic rat model. *Circulation* 101: 907, 2000.

35. **Moule SK, Welsh GI, Edgell NJ, Foulstone EJ, Proud CG and Denton RM.**
Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms. *J Biol Chem* 272: 7713-7719, 1997.
36. **Nielsen JN, Vissing J, Wojtaszewski JF, Haller RG, Begum N and Richter EA.**
Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1267-E1275, 2002.
37. **Oku A and Asano T.** Inhibitory effect of hyperglycemia on insulin-induced Akt/protein kinase B activation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 280: E816-E824, 2001.
38. **Oku A, Ueta K, Arakawa K, Ishihara K, Nawano M, Kuronuma Y, Matsumoto M, Saito A, Tsujihara K, Anai M, Asano T, Kanai Y and Endou H.** T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes. *Diabetes* 48: 1794-1800, 1999.
39. **Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619, 1993.
40. **Ouyang YB, Zhang XH, He QP, Wang GX, Siesjo BK and Hu BR.** Differential phosphorylation at Ser473 and Thr308 of Akt-1 in rat brain following hypoglycemic coma. *Brain Res* 876: 191-195, 2000.

41. **Pap M and Cooper GM.** Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphoinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273: 19929-19932, 1998.
42. **Penpargkul S, Schaible TF, Yipintsoi T and Scheuer J.** The effect of diabetes on performance and metabolism of rat hearts. *Circ Res* 47: 911-922, 1980.
43. **Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J and Dedhar S.** Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 97: 3207-3212, 2000.
44. **Ren J, Sowers JR, Walsh MF and Brown RA.** Reduced contractile response to insulin and IGF-1 in ventricular myocytes from genetically obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1708-H1714, 2000.
45. **Schubert KM, Scheid MP and Duronio V.** Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem* 275: 13330-13335, 2000.
46. **Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC and Izumo S.** Akt/Protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 22: 2799-2809, 2002.

47. **Sliker LJ, Sundell KL, Heath WF, Osborne HE, Bue J, Manetta J and Sportsman JR.** Glucose transporter levels in tissues of spontaneously diabetic Zucker fa/fa rat (ZDF/drt) and viable yellow mouse (Avy/a). *Diabetes* 41: 187-193, 1992.
48. **Sowers JR, Epstein M and Frohlich ED.** Diabetes, Hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 37: 1053-1059, 2001.
49. **Tian R and Abel ED.** Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation* 103: 2961-2966, 2001.
50. **Tremblay F, Lavigne C, Jacques H and Marette A.** Defective Insulin-Induced GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle of High Fat-Fed Rats Is Associated With Alterations in Both Akt/Protein Kinase B and Atypical Protein Kinase C (ζ/λ) Activities. *Diabetes* 50: 1901-1910, 2001.
51. **Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR and Klip A.** Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol* 19: 4008-4018, 1999.
52. **Welsh GI, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT and Proud CG.** Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Letters* 421: 125-130, 1998.

53. **Woodgett JR.** Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J* 9: 2431-2438, 1990.
54. **Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR and Kahn BB.** Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 6: 924-928, 2000.

Acknowledgements

Dr. A. Calderone is a Chercheur-Boursier Senior of the Fonds de Recherche en Santé du Québec. The expert technical assistance of Pierre Corriveau from the department of Kinesiology from Montreal University was greatly appreciated.

Chapitre 3

Manuscrit 2

Titre

Exercise training attenuated the PKB and GSK-3 dephosphorylation in the myocardium of ZDF rats.

Auteurs

Claude Lajoie, Angelino Calderone, François Trudeau, Nathalie Lavoie, Guy Massicotte, Sylvain Gagnon et Louise Béliveau.

Journal

Journal of Applied Physiology (2003)

Sommaire traduit

La maladaptation cardiaque est un effet sévère du diabète de *type 2*. Le recrutement de la voie signalétique de la protéine kinase B (PKB) et de la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) sont des événements essentiels de l'homéostasie du glucose, mais cette régulation est peu documenté dans le cœur diabétique. Ainsi, la présente étude prévoit tester l'hypothèse que la régulation de la voie PKB/GSK-3 est altérée dans le myocarde de rat Zucker diabetic fatty (ZDF) sévèrement atteint du diabète de *type 2*. De plus, il a déjà été démontré que l'exercice améliorait l'homéostasie du glucose. Ainsi, l'effet d'un programme d'entraînement à la nage sur la régulation de PKB/GSK-3 dans le cœur diabétique a donc été examiné. Chez le rat sédentaire ZDF, la glycémie et le contenu en glycogène étaient élevés en comparaison aux rats contrôles. Un entraînement à la nage de 13 semaines a significativement amélioré l'insulinémie et réduit la glycémie et le contenu en glycogène, en plus de normaliser la phosphorylation des résidus Serine⁴⁷³ et Threonine³⁰⁸ de PKB et de GSK-3 α chez le rat ZDF. En conclusion, l'hyperglycémie et l'augmentation du contenu en glycogène chez le rat ZDF étaient associés à des altérations au niveau de la phosphorylation de la voie signalétique de PKB/GSK-3. Ces anomalies chez le rat ZDF ont été partiellement normalisées par un entraînement à la nage. Ces données supportent la prémisse que l'entraînement physique pourrait protéger le cœur contre les effets néfastes du diabète de *type 2*.

Summary

Cardiac dysfunction is a severe secondary effect of *type 2* diabetes. Recruitment of the protein kinase B /glycogen synthase kinase-3 pathway represents an integral event in glucose homeostasis, albeit its regulation in the diabetic heart remains undefined. Thus, the following study tested the hypothesis that the regulation of protein kinase B / glycogen synthase kinase-3 was altered in the myocardium of the Zucker diabetic fatty rat. Second, exercise has been shown to improve glucose homeostasis, and in this regard the effect of swimming training on the regulation of protein kinase B / glycogen synthase kinase-3 in the diabetic rat heart was examined. In the sedentary Zucker diabetic fatty rats, glucose levels were elevated, and cardiac glycogen content increased, as compared to wild type. A 13-week swimming regimen significantly reduced plasma glucose levels and cardiac glycogen content, and partially normalized protein kinase B -Serine⁴⁷³, protein kinase B -Threonine³⁰⁸, and glycogen synthase kinase-3 α phosphorylation in Zucker diabetic fatty rats. In conclusion, hyperglycemia and increased cardiac glycogen content in the Zucker diabetic fatty rats were associated with dysregulation of protein kinase B / glycogen synthase kinase-3 phosphorylation. These anomalies in the Zucker diabetic fatty rat were partially normalized with swimming. These data support the premise that exercise training may protect the heart against the deleterious consequences of diabetes.

Introduction

Type 2 diabetes is a prevalent cause of morbidity and mortality, mainly due to cardiovascular complications^{14,29,53}. The underlying events remain unclear, but a decrease of myocardial glucose oxidation represents an early pathophysiological event and occurs prior to both contractile and pathological changes¹. The serine/threonine protein kinase B (PKB) is an intracellular signalling enzyme activated following insulin binding to its cognate receptor, and implicated in glucose homeostasis²⁸. The latter was confirmed in transgenic studies, as mice lacking PKB β expression displayed many features of *type 2* diabetes observed in humans, including hyperglycemia, insulinemia, and hepatic insulin resistance⁷. PKB is biologically active following the dual phosphorylation of the threonine³⁰⁸ residue in the kinase domain and the serine⁴⁷³ residue in the hydrophobic C-terminal regulatory domain². The mechanisms behind this dual phosphorylation remain unclear. Phosphorylation can be induced by IGF-1 or insulin, through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway³. Phosphorylation of threonine³⁰⁸ can then be mediated by 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). Regulation of the phosphorylation of the serine⁴⁷³ residue is less understood. It could involve various signalling events including the putative kinase PDK-2, that could be modulated by exercise or by many molecules such as ceramides or ILK^{33,45,51}. A putative physiological substrate of PKB is glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), a ubiquitously expressed serine/threonine kinase with two related isoforms, GSK-3 α (serine²¹) and GSK-3 β (serine⁹)⁵⁶. PKB-mediated phosphorylation of GSK-3 leads to inactivation of the enzyme, thereby maintaining glycogen synthase in a dephosphorylated active state,

leading to glycogen synthesis ¹¹. It has been documented that diabetic rat hearts accumulate glycogen, and that high glycogen content diminished the physiological action of insulin ^{5,12,38}.

Although the mechanism(s) contributing to impaired myocardial glucose homeostasis in the setting of diabetes remain undefined, dysregulation of PKB and GSK-3 may represent a salient pathophysiological event. In this regard, the following study tested the hypothesis that phosphorylation of the PKB/GSK-3 pathway was impaired in the myocardium of the Zucker diabetic fatty rat (ZDF), an insulin-resistant animal model that genetically manifests characteristics of *type 2* diabetes observed in humans ⁸ and significant alterations in oxidative and non-oxidative cardiac carbohydrate metabolism ⁴. Second, exercise training was shown to reduce the risk of heart disease and improve diabetic-mediated cardiovascular abnormalities ^{17,36,43,44}. Moreover, in insulin-resistant human subjects and in the obese Zucker non-diabetic rat, exercise normalised the action of insulin and enhanced glycogen synthesis ^{16,46}. Based on these observations, a second series of experiments were performed to test the hypothesis that swimming exercise can ameliorate the regulation of PKB/GSK-3 in the myocardium of ZDF rats.

Materials and Methods

All protocols were approved by the Animal Care Committee of University of Quebec in Trois-Rivières and followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, 1985). Nine week-old obese male ZDF (ZDF/Gmi fa/fa) and weight matched non-diabetic litter mates (ZDF/Gmi +/fa) were obtained from Genetic

Models (Gmi™, Indianapolis, IN, USA). To develop severe obesity this model uses the Purina 5008 diet. It was not used in the present study in order to weight-match the animals and to avoid excessive buoyancy that could have decreased the training stimulus. Instead a standard rat diet was used; and the animals were fed *ad libitum*. The 16 ZDF rats were randomly divided into two groups; ZDF exercise (ZDF Exe, n=8), ZDF sedentary (ZDF Sed, n=8), as were the WT; wild type exercise (WT Exe, n=8) and wild type sedentary (WT Sed, n=8). The light/dark cycle was 12h/12h.

Exercise-training regimen. Rats initially swam 15 min/day (five days/week) in a temperature controlled bath set at 36°C, and duration was gradually increased by 15 min/week until a regimen of 150 min/day was achieved. Training lasted for 13 weeks.

Experimental procedures. Blood glucose was measured each week with a glucometer (Elite XL, Bayer, Toronto, Ont, Canada), using blood taken from the tail. Hyperglycemia was defined as a blood glucose level >15 mM. Once hyperglycemia was established, rats immediately began the training regimen. Forty-eight hours after the last training period, rats were anesthetized with isoflurane (Janssen, Toronto, Ont, Canada) and sacrificed by decapitation. All experiments were performed in the morning. Blood samples were collected from the neck into heparinized glass test tubes for plasma glucose (Glucose oxydase kit; Sigma, Oakville, Ont, Canada) and insulin measurements by radioimmunoassay (Linco Research, St-Charles, MO, USA). After blood sampling, the heart and muscles were rapidly excised. The heart was separated into atria, left and right ventricles. All tissues were weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until tissue analysis.

Tissue homogenization and sample preparation. The left ventricle and the rectus femoris were pulverized in a mortar cooled with liquid nitrogen, and subsequently transferred to a lysis buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.4, 1% triton X-100, 0.5% Nonidet P-40 protease inhibitors (0.5 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin), phosphatase inhibitors (100 µM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride) and homogenized. Lysates were subsequently centrifuged at 12 000 g, 4°C, for 10 min to remove insoluble material. The supernatant was removed, and protein content was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Western Blot Analysis. Left ventricular lysate (100-200 µg) was subjected to SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis, and subsequently transferred to Hybond-C membrane (Amersham Limited, Piscataway, NJ, USA). Equal loading of the samples was confirmed by Ponceau S staining. Membranes were blocked with either 5% BSA or 5% skim milk in Tris-buffered saline + Tween 20 (TBST; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0,1 % Tween 20) (v/v) for 90 min at room temperature prior to the addition of the primary antibody. Antibodies directed against PKB protein (Santa Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA, USA), PKB Thr³⁰⁸, PKB Ser⁴⁷³, GSK-3β protein, phospho-GSK-3α/β (Cell signaling; Beverly, MA, USA) and HSP-72 (Stressgen; Victoria, BC, Canada) were prepared at a concentration of 1:1000 (PKB and GSK-3) or 1:20 000 (HSP-72) in either TBST+5 % BSA (PKB and GSK-3) or TBST+5 % skim milk (HSP-72), and incubated for 18 hrs at 4°C. Following incubation, the membranes were washed with TBST, subjected to the appropriate secondary antibody (conjugated to

horse radish peroxidase) for 1-2 hrs at room temperature, and the bands subsequently detected by autoradiography utilizing the ECL detection kit (Amersham Limited, Piscataway, NJ, USA). Films were quantified using a flatbed scanner and Scion image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Glycogen content and phosphofructokinase activity. Glycogen concentration in the left ventricle was determined spectrophotometrically using sulfuric acids as described by Lo and al.³⁰. Cardiac homogenates for phosphofructokinase (PFK) activity were prepared in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 8.2, containing 10 mM glutathione, 0,5 mM ATP, 5 mM MgCl₂, and 30 mM NaF. PFK activity was measured spectrophotometrically at 30°C using a coupling system as described by Mansour and al.³⁴.

Statistics. Data are expressed as units or percent change \pm SEM. Sedentary ZDF were compared to sedentary WT, whereas the effect of swimming in either the WT or ZDF rat was calculated as fold-increase versus its appropriate sedentary control. Data were analyzed by a two-way ANOVA followed by Newman Keuls post-hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Morphologic data, plasma glucose, insulin levels and glycogen content of the sedentary ZDF rat. Body weight, heart weight and HW/BW ratio were similar between WT and ZDF sedentary groups (Table 1). ZDF rats were hyperglycaemic at 12 weeks of age and plasma glucose levels progressively rose, whereas they remained normal in the WT sedentary rats throughout the study (Table 2 & Figure 1). At the time of sacrifice, plasma insulin levels were similar in the ZDF rat and WT sedentary rats (Table 2). Left ventricular glycogen content was significantly elevated by 63% in the left ventricle of the sedentary ZDF rats, as compared to the WT rat (Table 2).

Effect of exercise on morphologic data, glycemia, insulin levels and glycogen content in the WT and ZDF rat. Exercise trained wild type animals showed a significantly lower body weight, causing an increase in heart weight/body weight (HW/BW) ratio (Table 1). By contrast, swimming had no effect on body weight and HW/BW in the ZDF rat (Table 1). Glycogen content was lower in both the WT (-33%) and the ZDF exercise (-20%) rats (Table 2). Plasma glucose levels in the ZDF rat were significantly lower in the exercise group, by $12 \pm 2\%$ (Table 2 & Figure 2). There was a tendency for a decrease in plasma insulin levels in the exercised WT rat as compared to sedentary WT, but this did not reach statistical significance (Table 2). By contrast, exercise increased plasma insulin levels in the ZDF rat by $70 \pm 28\%$ (Table 2).

Regulation of PKB and GSK phosphorylation in the left ventricle of the sedentary ZDF rat. In the left ventricle of sedentary ZDF rats, a decreased phosphorylation state of PKB Thr³⁰⁸ (-67%; $p < 0.001$) and PKB Ser⁴⁷³ (-63%; $p < 0.0001$) residues was observed, as compared to WT rats (Figure 2). However, total PKB protein content was similar in ZDF and WT rats (Figure 2). GSK-3 α Ser²¹ phosphorylation was significantly reduced (-64%; $p < 0.01$) in the ZDF rat, as compared to WT (Figure 3). By contrast, the phosphorylation state of GSK-3 β Ser⁹ was only modestly reduced in the ZDF rat. However, total GSK-3 protein content was similar in ZDF and WT rats (Figure 3).

Effect of exercise on regulation of PKB and GSK-3 phosphorylation in the left ventricle of WT and ZDF rats. In the WT rat, exercise was associated with a disparate pattern of PKB regulation, as PKB Thr³⁰⁸ phosphorylation was significantly decreased (-41%; $p < 0.01$), whereas PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation was unaffected, as compared to sedentary WT rats (Figure 2). Interestingly, GSK-3 α Ser²¹ phosphorylation was unaffected in the WT rats following swimming, whereas GSK-3 β Ser⁹ phosphorylation was significantly enhanced (68%; $p < 0.05$), as compared to sedentary WT (Figure 3). In the ZDF rats, the decreased PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation of the sedentary animals was partially reversed following 13 weeks of swimming (Figure 2). Exercise training reduced glycogen content in both exercise groups, and a significant negative correlation was observed between glycogen content and PKB Ser⁴³⁷ in all groups ($r = -0.65$; $P < 0.05$). Interestingly, PKB Thr³⁰⁸ phosphorylation of the exercised ZDF rat was also significantly increased, as compared to sedentary ZDF,

and the level of phosphorylation was equivalent to that observed in the exercised WT rat (Figure 2). The significant reduction in GSK-3 α Ser²¹ phosphorylation in exercise ZDF was partially normalized. The modest reduction of GSK-3 β Ser⁹ phosphorylation in the sedentary ZDF rat was normalized by exercise (Figure 3).

Regulation of PKB in the skeletal muscle of the sedentary ZDF rat. In the rectus femoris of sedentary and exercise ZDF rats, the phosphorylation state of PKB Ser⁴⁷³ increased by 111% and 136% respectively, as compared to WT rats (Figure 4). Interestingly, the latter increase was associated with a 54% mean decrease in PKB total protein expression. PKB protein expression and phosphorylation was unaffected following swimming in the rectus femoris.

Regulation of heat shock protein 72 (HSP-72) and PFK in sedentary ZDF. HSP-72 protein expression, as well as PFK activity (Table 2), were not different in the LV of sedentary ZDF and WT.

Regulation of heat shock protein 72 (HSP-72) and PFK in exercised WT and ZDF rats. HSP-72 protein expression in the left ventricle was increased by 51 and 82 % respectively in ZDF and WT rats in response to swimming ($p < 0,001$). Cardiac PFK activity was increased in the heart of exercise WT, as compared to sedentary WT rats. By contrast, swimming had no effect on cardiac PFK activity in the ZDF rat (Table 2).

Discussion

Abnormal myocardial glucose homeostasis represents an early pathophysiological event in diabetes and occurs prior to both contractile and pathological changes¹. The insulin-resistant ZDF rat manifests numerous significant alterations in oxidative and non-oxidative cardiac carbohydrate metabolism⁴. The early progression of the disease in the ZDF rat is associated with elevated plasma insulin levels. During the latter stages of the disease, pancreatic beta cells do not respond to elevated plasma glucose leading to a reduction of insulin secretion and subsequent plasma levels⁹. In the present study, elevated plasma glucose in the ZDF rat was accompanied by a modest elevation of plasma insulin levels, as compared to WT, thereby supporting the premise that pancreatic beta cell production of insulin was impaired at the time of sacrifice.

PKB activation by insulin via a PI3-K-dependent pathway requires the dual phosphorylation of the threonine³⁰⁸ and serine⁴⁷³ residues, which are critical to achieve a high level of PKB activity². The role of PKB in glucose homeostasis includes the inactivation of glycogen synthase kinase-3¹¹. The phosphorylation level of both residues of PKB in the left ventricle of sedentary ZDF rats was significantly decreased, without a change in total PKB protein content. Consistent with these data, reduced PKB activity and/or phosphorylation was observed in the myocardium and skeletal muscle of various other diabetic rat models and patients with *type 2* diabetes^{16,19,22,23,27,50}. It should however be mentioned that other studies have shown no reduced PKB activity/phosphorylation in muscles of patients with *type 2* diabetes²¹. Interestingly, we observed an increase in PKB serine⁴⁷³ phosphorylation in the rectus

femoris muscles of the ZDF animals, accompanied by a decrease in total PKB protein. It could be speculated that these observations are interrelated, representing a compensatory mechanism for the decreased protein expression. In the present study, these changes occurred despite a similar plasma insulin concentration in the ZDF and control animals, suggesting an alteration in insulin reactivity or in the signaling pathway prior to PKB. Thus, compromised PKB regulation in the myocardium and skeletal muscle of the ZDF rat may in part contribute to abnormal glucose homeostasis.

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is a serine/threonine kinase consisting of two isoforms (GSK-3 α , and GSK-3 β), and phosphorylated following exposure to insulin¹¹. Phosphorylation of GSK-3 is facilitated by PKB, resulting in inactivation of the enzyme, and a subsequent increase in glycogen synthesis via increase activity of the enzyme glycogen synthase¹¹. In the streptozotocin (STZ) diabetic rat heart, insulin stimulation of endogenous GSK-3 phosphorylation via PKB is impaired²⁷. Consistent with the decreased PKB phosphorylation reported in the present study, GSK-3 α/β phosphorylation was reduced in the myocardium of the ZDF rats, as compared to WT rats, thereby suggesting increased enzymatic activity. This latter finding would appear to be inconsistent with the elevated glycogen content in the left ventricle of the sedentary ZDF rat. Indeed, increased GSK-3 activity would promote glycogen synthase phosphorylation, thereby decreasing enzyme activity and subsequent glycogen synthesis¹¹. It is well known that diabetes provokes an increase in heart glycogen content, despite a decline in the amount of active glycogen synthase present²⁶. High cardiac concentrations of glycogen alone can result in inactivation of

glycogen synthase⁴⁸. In the myocyte, an inverse relationship has been shown between glycogen concentration and the percentage of glycogen synthase in the active form¹⁸. It is possible that high glycogen content may act as a regulator of GSK-3, to limit further accumulation. We observed a significant negative correlation between glycogen and both GSK-3 residues phosphorylation ($r = -0,57$; $P < 0,05$).

In the WT rat, a 13-week swimming regimen significantly decreased body weight, plasma glucose levels remained normal, and a modest decrease in plasma insulin concentration was observed. By contrast, body weight remained unchanged, plasma glucose levels were significantly decreased, and plasma insulin concentration increased in the exercised ZDF rat, as compared to sedentary ZDF. These data indicate that swimming improved plasma glucose levels in the ZDF rat. The increased concentration of plasma insulin is consistent with previous reports highlighting a similar observation with physical training in human and rat models of *type 2* diabetes^{24,52}. Whether the increase in plasma insulin concentration was associated with the improved PKB/GSK-3 phosphorylation in the myocardium of the exercised ZDF rat remains undefined.

In skeletal muscle, it has previously been shown that decreased PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation was partially restored following chronic exercise combined with troglitazone, an insulin sensitizer that activates the peroxisome proliferator receptor- γ , in the non-diabetic Zucker rat¹⁶. Similarly, Luciano and al.³³ observed that 6 weeks of swimming training increased PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation and GLUT-4 expression in rat skeletal muscles following insulin infusion. Based on these observations, the present study examined whether a swimming regimen for the ZDF rat would improve

the status of PKB phosphorylation in the heart. Indeed, exercise significantly increased PKB serine⁴⁷³ and threonine³⁰⁸ phosphorylation in the ZDF rat. This novel finding was associated with increased insulinemia, decreased glycemia and glycogen content. One possible explanation for the improved phosphorylation level of PKB in the myocardium of the ZDF rat, might be a mechanism related to glycemia. Chronic hyperglycemia reduces the efficiency of the activation step from PI3-kinase to PKB⁴¹ and normalized glycemia has been shown to bring the phosphorylation and activity of PKB to normal level⁴², a finding similar to the effect of exercise in this study. In the WT rats, swimming did not alter PKB serine⁴⁷³ phosphorylation, but unexpectedly reduced threonine³⁰⁸ phosphorylation. A disparate pattern of PKB residue phosphorylation has been previously observed in ceramide-treated TF-1 cells, as threonine³⁰⁸ phosphorylation was decreased, whereas the phosphorylation state of serine⁴⁷³ remained unchanged⁵¹. The PKB activity in the exercised WT rat may thus be diminished, but probably not to the same extent as in the sedentary ZDF rat, where the phosphorylation level of both residues of PKB was markedly reduced. Exercise training might have contributed to maintain glucose homeostasis despite reduced PKB Thr³⁰⁸ by a mechanism involving increased contractile activity. Contractile activity increases plasma membrane glucose transporters even in the absence of insulin¹³. Hence, PKB activity via the usual insulin-signaling pathway (PI3-K) might be not fully required for glucose homeostasis. Markuns and al.³⁵ found that insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanisms and that deactivation of GSK-3 was induced by a PKB-independent mechanism in rat skeletal muscle. Consistent with the improved phosphorylation state of PKB in the ZDF rat following exercise, the decreased phosphorylation of GSK-3 α Ser²¹ and

GSK-3 β Ser⁹ residues were partially reversed with swimming. Thus swimming training in the diabetic ZDF rat ameliorated the phosphorylation status of the PKB/GSK-3 pathway which may in part improve glucose homeostasis in the myocardium.

PFK is an enzyme associated with the rate of glycolytic flux, which can be up-regulated with exercise training³⁹. We investigated PFK activity to verify the effect of the training protocol. PFK activity in the myocardium of WT and ZDF sedentary rats was similar. However, its activity increased only in the exercised WT rats. The absence of increased PFK activity in the exercised ZDF rat may in part be related to a variety of factors such as the presence of *type 2* diabetes or a different body composition, which could have influenced exercise intensity. We have also measured HSP-72, to evaluate the effect of training in the heart. Although it is not a classical training index, it has been reported that HSP-72 increased in the heart with exercise training^{31,40}. HSP-72 was increased in ZDF as well as in WT animals. Exercise training may thus have protected the myocardium of both exercise groups by means of enhanced HSP-72 expression. To our knowledge, it is not clear whether HSP-72 expression is modified in the diabetic heart. However, studies have shown that heat shock protein mRNA content is reduced in muscle from *type 2* diabetic patients and correlates with insulin resistance²⁵. Enhanced HSP-72 expression could improve recovery of myocardial mechanic⁴⁷ after ischemia³², reduce infarct size²⁰ and decrease myocardial apoptosis^{37,54}.

As mentioned previously, hearts of diabetic rats accumulate glycogen^{5,6}. In this study, heart glycogen content was much elevated in sedentary ZDF compared to control

rats, despite similar insulinemia. Exercise training of moderate intensity was shown to reduce glycogen synthesis in fed STZ-diabetic rats recovering from prolonged exercise¹⁵. In the present study exercise training reduced heart glycogen content in exercised ZDF. This was probably not due to the effect of the last bout of exercise, because measurements were done forty-eight hours after the last training period. It has been shown¹⁰ that glycogen content in hearts from control animals is reduced immediately following exercise, but unchanged 24-h after the cessation of work when compared to the preexercise value. Furthermore, the latter group found in the diabetic rat heart that glycogen content, which was initially twice the normal group, was not significantly altered after exercise. High blood glucose level per se is known to increase glucose uptake in peripheral tissues by a mass action effect⁵⁵, leading to enhanced glycogen content. It has been suggested that exercise-induced depletion of the muscle glycogen stores secondarily improved insulin responsiveness⁴⁹. Moreover, it has been demonstrated that insulin signalling, including PKB activation was in part negatively regulated by muscle glycogen content^{12,38}. Thus, it is possible that the elevated content of glycogen in the myocardium of ZDF rats may have partially suppressed insulin-dependent activation of the PKB/GSK-3 pathway.

In conclusion, the present study demonstrated a decreased phosphorylation of PKB and GSK-3 in the myocardium of the ZDF rat. The dysregulation of PKB/GSK-3 could contribute to the reported abnormal glucose homeostasis in the myocardium of *type 2* diabetic rats. Training improved phosphorylation of both PKB residues and partially normalized GSK-3 phosphorylation in the ZDF rat heart. In addition, exercise training significantly reduced glycemia and heart glycogen content with a

concomitant increase in plasma insulin levels. It is tempting to suggest that the reduction of cardiac glycogen content in the exercised ZDF rat may have at least in part contributed to the improved phosphorylation status of PKB.

List of Figures

Fig 1: Effect of exercise on glucose concentration over weeks. Results are average \pm SEM.* $p < 0.05$ ZDF Sed vs ZDF Exe.

Fig 2: Effect of diabetes and exercise on PKB phosphorylation in Wild type and ZDF rats. A: Western blots of PKB protein expression, PKB Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ phosphorylation site in Wild type and ZDF with or without exercise. B: Percent change from control levels for each blot, $n = 5-7/\text{group}$. * $p < 0.05$ vs WT Sed. $\dagger p < 0.05$ vs ZDF Sed. # $p < 0.001$ vs WT Exe. Results are average \pm SEM.

Fig 3: Effect of diabetes and exercise on GSK-3 α/β phosphorylation in Wild type and ZDF rats. A: Western blots of GSK-3 β protein expression, phospho-GSK-3 α and β isoforms in Wild type and ZDF with or without exercise. B : Percent change from control levels for each blot, $n = 5-7/\text{group}$. * $p < 0.01$ vs WT Sed. $\dagger p < 0.05$ vs ZDF Sed. Results are average \pm SEM.

Fig 4: Effect of diabetes and exercise on PKB phosphorylation in the rectus femoris of Wild type and ZDF rats. A: Western blots of PKB protein expression and Ser⁴⁷³ phosphorylation in Wild type and ZDF with or without exercise. B: Percent change from control levels for each blot, $n = 5-7/\text{group}$. # $p < 0.05$ vs WT Sed. * $p < 0.001$ vs WT Sed. Results are average \pm SEM.

Table 1**Morphological data at sacrifice.**

	WT Sed	ZDF Sed	WT Exe	ZDF Exe
Body weight (g)	427 ± 10	438 ± 18	366 ± 5 ^{††}	434 ± 10
HW (g)	1.33 ± 0.04	1.29 ± 0.04	1.31 ± 0.03	1.32 ± 0.04
HW/BW (mg/g)	3.1 ± 0.06	2.96 ± 0.06	3.57 ± 0.06 ^{††}	3.05 ± 0.08

* significantly different from WT Sed and WT Exe , $p < 0.001$, † significantly different from ZDF Sed, $p < 0.05$, †† significantly different from all groups , $p < 0.01$. Results are average ± SEM.

Table 2**Insulinemia, glycemia, cardiac glycogen concentration and PFK activity**

	WT Sed	ZDF Sed	WT Exe	ZDF Exe
Plasma glucose (mM)	8.5 ± 0.3	32.2 ± 0.8*	7.9 ± 0.4	28.4 ± 0.9*†
Plasma insulin (pmol/l)	229 ± 49	277 ± 71	105 ± 16	472 ± 73*†
Cardiac PFK (μmol/g/min)	13,5 ± 0,6	14,8 ± 0,3	18,9 ± 0,4††	13,6 ± 0,9
Cardiac glycogen (μg/mg wet weight of LV)	1,8 ± 0,01††	3,0 ± 0,01††	1,2 ± 0,01††	2,4 ± 0,02††

* significantly different from WT Sed and WT Exe , $p < 0.001$, † significantly different from ZDF Sed, $p < 0.05$, †† significantly different from all groups , $p < 0.01$. Results are average ± SEM.

Reference List

1. **Abe T, Ohga Y, Tabayashi N, Kobayashi S, Sakata S, Misawa H, Tsuji T, Kohzuki H, Suga H, Taniguchi S, Takaki M.** Left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus model rats. *Am J Physiol* 282: H138-H148, 2002.
2. **Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO* 15: 6541-6551, 1996.
3. **Burgering BM, Coffey PJ.** Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376: 599-602, 1995.
4. **Chatham JC, Seymour AM.** Cardiac carbohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Res* 55: 104-112, 2002.
5. **Chen V, Ianuzzo CD.** Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Can J Physiol Pharmacol* 60: 1251-1256, 1982.
6. **Chen V, Ianuzzo CD, Fong BC, Spitzer JJ.** The effects of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats. *Diabetes* 33: 1078-1084, 1984.
7. **Cho H, Mu J, Kim J, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw III EB, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ.** Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 292: 1728-1731, 2001.
8. **Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN.** The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 173: 68-75, 1983.
9. **Cockburn BN, Ostrega DM, Sturis J, Kubstrup C, Polonsky KS, Bell GI.** Changes in pancreatic islet glucokinase and hexokinase activities with increasing age, obesity, and the onset of diabetes. *Diabetes* 46: 1434-1439, 1997.
10. **Conlee RK, Tipton CM.** Cardiac glycogen repletion after exercise: influence of synthase and glucose 6-phosphate. *J Appl Physiol* 42: 240-244, 1977.
11. **Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.** Inhibition of glycogen synthase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789, 1995.
12. **Derave W, Hansen BF, Lund S, Kristiansen S, Richter EA.** Muscle glycogen content affects insulin-stimulated glucose transport and protein kinase B activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E947-E955, 2000.

13. **Goodyear LJ, King PA, Hirshman MF, Thompson CM, Horton ED, Horton ES.** Contractile activity increases plasma membrane glucose transporters in absence of insulin. *Am J Physiol* 258: E667-E672, 1990.
14. **Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M.** Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 339: 229-234, 1998.
15. **Hamilton N, Noble EG, Ianuzzo CD.** Glycogen repletion in different skeletal muscles from diabetic rats. *Am J Physiol* 247: E740-E746, 1984.
16. **Hevener AL, Reichart D, Olefsky J.** Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. *Diabetes* 49: 2154-2159, 2000.
17. **Hu FB, Stampfer MJ, Solomon C, Liu S, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Manson JE.** Physical activity and risk for cardiovascular events in diabetic women. *Ann Intern Med* 134: 96-105, 2001.
18. **Huijing F, Nuttall FQ, Villar-Palasi C, Larner J.** UDPglucose:alpha-I,4-glucan alpha-4-glucosyltransferase in heart regulation of the activity of the transferase in vivo and in vitro in rat. A dissociation in the action of insulin on transport and on transferase conversion. *Biochim Biophys Acta* 177: 204-212, 1969.
19. **Huisamen B, Donthi RV, Lochner A.** Insulin in combination with vanadate stimulates glucose transport in isolated cardiomyocytes from obese Zucker rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 15: 445-452, 2001.
20. **Hutter MM, Sievers RE, Barbosa V, Wolfe CL.** Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Circulation* 89: 355-360, 1994.
21. **Kim Y-B, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB.** Normal insulin-dependent activation of akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 104: 733-741, 1999.
22. **Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR.** Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes* 46: 2110-2114, 1997.
23. **Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H.** Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 1998.

24. **Krotkiewski M, Lonnroth P, Mandroukas K, Wroblewski Z, Rebuffe-Scrive M, Holm G, Smith U, Bjorntorp P.** The effects of physical training on insulin secretion and effectiveness and on glucose metabolism in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 28: 881-890, 1985.
25. **Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, Koranyi L.** Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* 51: 1102-1109, 2002.
26. **Laughlin MR, Petit WA, Jr., Shulman RG, Barrett EJ.** Measurement of myocardial glycogen synthesis in diabetic and fasted rats. *Am J Physiol* 258: E184-E190, 1990.
27. **Laviola L, Belsanti G, Davalli AM, Napoli R, Perrini S, Weir GC, Giorgino R, Giorgino F.** Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. *Diabetes* 50: 2709-2720, 2001.
28. **Lawlor MA, Alessi DR.** PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Science* 114: 2903-2910, 2001.
29. **Lehto S, Ronnema T, Haffner SM, Pyorala K, Kallio V, Laakso M.** Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. *Diabetes* 46: 1354-1359, 1997.
30. **Lo S, Russell JC, Taylor AW.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236, 1970.
31. **Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Feild MR, Ianuzzo SE, Ianuzzo CD.** Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol* 268: C1387-C1394, 1995.
32. **Locke M, Tanguay RM, Klabunde RE, Ianuzzo CD.** Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am J Physiol* 269: H320-H325, 1995.
33. **Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carvalheira JB, Peres SB, Reis MA, Saad MJ, Boschero AC, Velloso LA.** Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol* 147: 149-157, 2002.
34. **Mansour TE, Wakid N, Sprouse HM.** Studies on heart phosphofructokinase. Purification, crystallization, and properties of sheep heart phosphofructokinase. *J Biol Chem* 241: 1512-1521, 1966.

35. **Markuns JF, Wojtaszewski JF, Goodyear LJ.** Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanisms in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 274: 24896-24900, 1999.
36. **Mokhtar N, Lavoie JP, Rousseau-Mignerot S, Nadeau A.** Physical training reverses defect in mitochondrial energy production in heart of chronically diabetic rats. *Diabetes* 42: 682-687, 1993.
37. **Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B.** Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 5317-5327, 1997.
38. **Nielsen JN, Vissing J, Wojtaszewski JF, Haller RG, Begum N, Richter EA.** Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1267-E1275, 2002.
39. **Noble EG, Ianuzzo CD.** Influence of training on skeletal muscle enzymatic adaptations in normal and diabetic rats. *Am J Physiol* 249: E360-E365, 1985.
40. **Noble EG, Moraska A, Mazzeo RS, Roth DA, Olsson MC, Moore RL, Fleshner M.** Differential expression of stress proteins in rat myocardium after wheel or treadmill run training. *J Appl Physiol* 86: 1696-1701, 1999.
41. **Oku A, Asano T.** Inhibitory effect of hyperglycemia on insulin-induced Akt/protein kinase B activation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 280: E816-E824, 2001.
42. **Oku A, Ueta K, Arakawa K, Ishihara K, Nawano M, Kuronuma Y, Matsumoto M, Saito A, Tsujihara K, Anai M, Asano T, Kanai Y, Endou H.** T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes. *Diabetes* 48: 1794-1800, 1999.
43. **Osborn BA, Daar JT, Laddaga RA, Romano FD, Paulson DJ.** Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. *J Appl Physiol* 82: 828-834, 1997.
44. **Paulson DJ, Kopp SJ, Peace DG, Tow JP.** Improved postischemic recovery of cardiac pump function in exercised trained diabetic rats. *J Appl Physiol* 65: 187-193, 1988.
45. **Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, Dedhar S.** Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 97: 3207-3212, 2000.
46. **Perseghin G, Price TB, Petersen KF, Roden M, Cline GW, Gerow K, Rothman DL, Shulman GI.** Increased glucose transport-phosphorylation and muscle

glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *N Engl J Med* 335: 1357-1362, 1996.

47. **Pshennikova MG, Prodius PA, Sazontova TG, Golantsova NE, Malyshev II.** The role of HSP 70 and Ca(2+)-pump from the myocardial sarcoplasmic reticulum in cardioprotective effects during adaptation to physical load in rats. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova* 84: 1214-1222, 1998.
48. **Ramachandran C, Angelos KL, Walsh DA.** Cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent antagonism of insulin activation of cardiac glycogen synthase. *J Biol Chem* 257: 1448-1457, 1982.
49. **Richter EA, Derave W, Wojtaszewski JFP.** Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol* 535: 313-322, 2001.
50. **Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, Galuska D, Bauman DE, Barbano DM, Charron MJ, Zierath JR, Houseknecht KL.** Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes* 50: 1149-1157, 2001.
51. **Schubert KM, Scheid MP, Duronio V.** Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem* 275: 13330-13335, 2000.
52. **Shima K, Zhu M, Noma Y, Mizuno A, Murakami T, Sano T, Kuwajima M.** Exercise training in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus: effects on the B- cell mass, insulin content and fibrosis in the pancreas. *Diabetes Res Clin Pract* 35: 11-19, 1997.
53. **Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED.** Diabetes, Hypertension, and cardiovascular disease. *Hypertension* 37: 1059, 2001.
54. **Suzuki K, Sawa Y, Kagisaki K, Taketani S, Ichikawa H, Kaneda Y, Matsuda H.** Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70. *Basic Res Cardiol* 95: 397-403, 2001.
55. **Vaag A, Hother-Nielsen O, Skott P, Andersen P, Richter EA, Beck-Nielsen H.** Effect of acute hyperglycemia on glucose metabolism in skeletal muscles in IDDM patients. *Diabetes* 41: 174-182, 1992.
56. **Woodgett JR.** Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO* 9: 2431-2438, 1990.

Figure 1

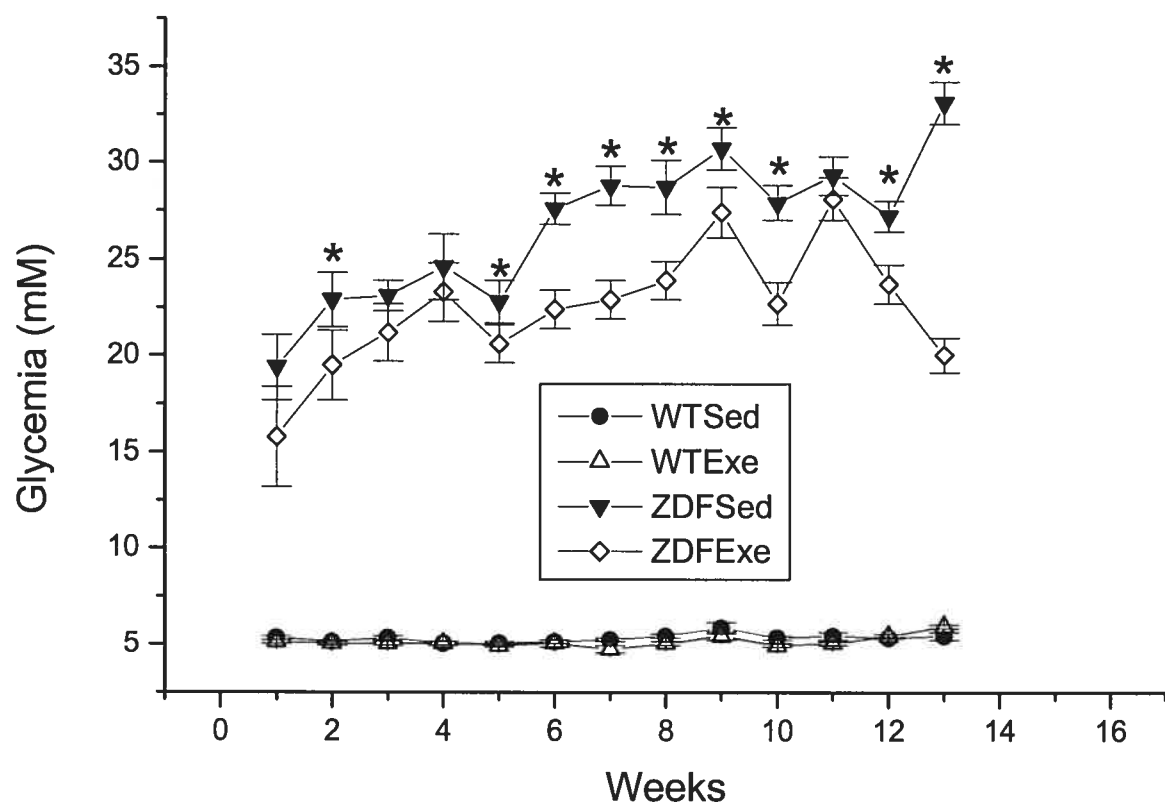


Figure 2

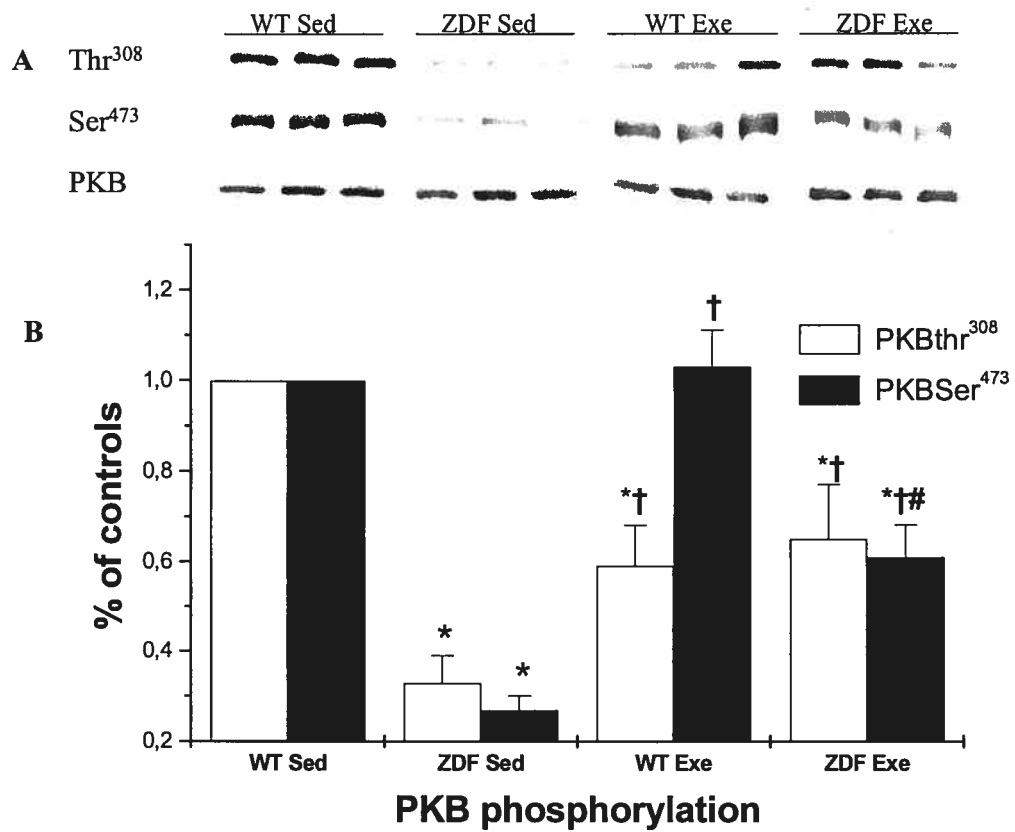


Figure 3

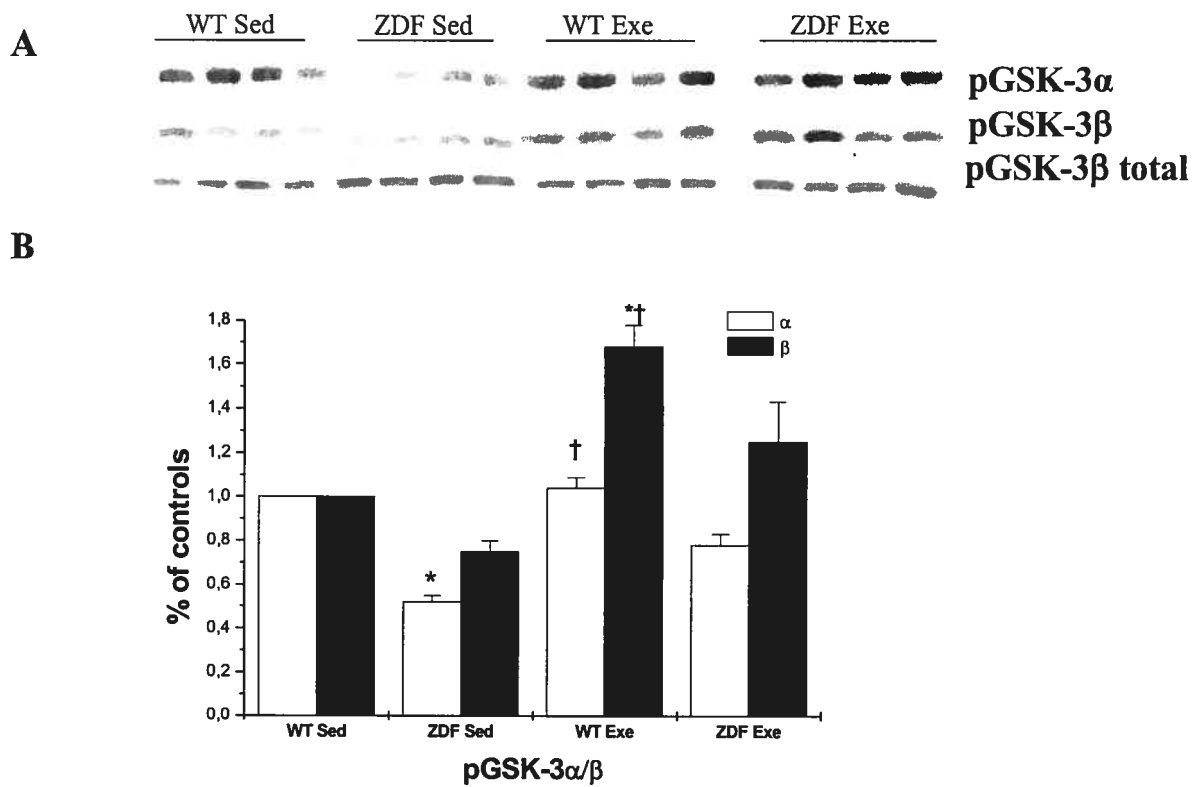
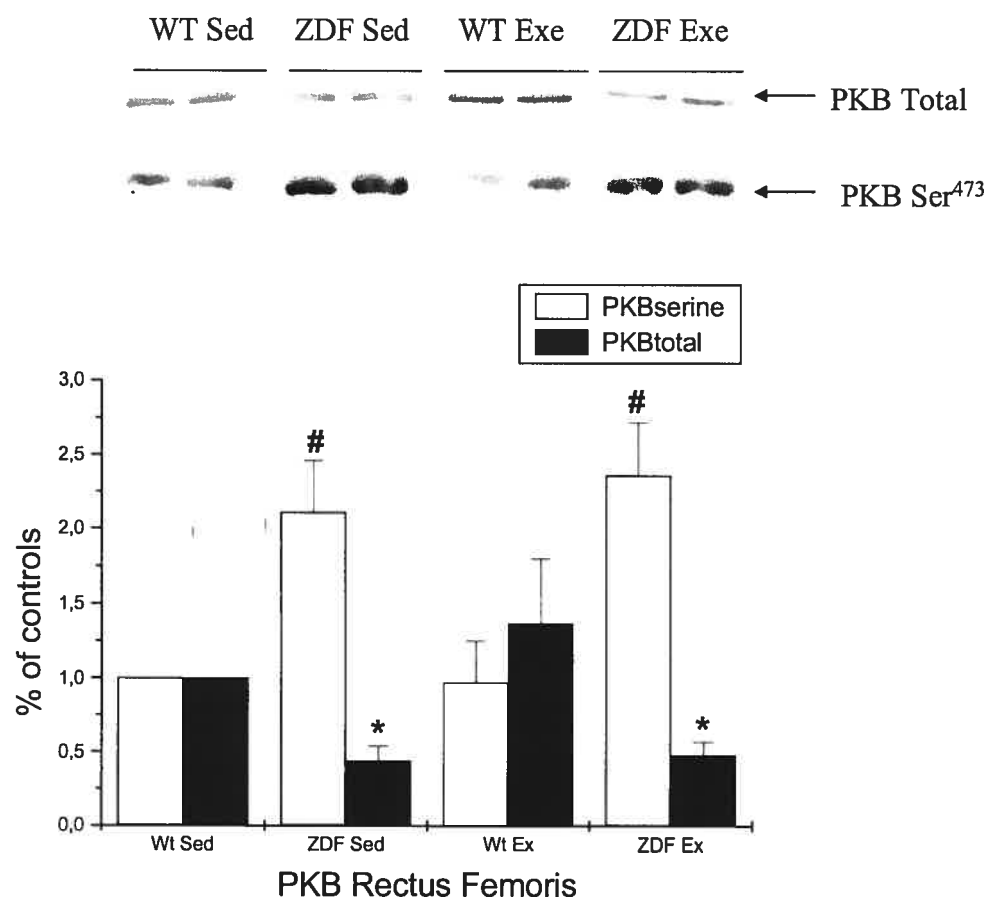


Figure 4



Chapitre 4

Manuscrit 3

Titre

Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell survival in spontaneously hypertensive rats.

Auteurs

Claude Lajoie, Angelino Calderone et Louise Béliveau.

Journal

Journal of Applied Physiology

Soumis, Décembre 2003

Sommaire traduit

Les effets potentiels de l'entraînement physique sur les événements signalétique associés à l'apoptose et à la protection myocardique du cœur hypertendu demeurent peu connus. À cet égard, des rats spontanément hypertendus (SHR) ont été entraînés 5 jours/sem sur un tapis roulant (18 m/min, 120 min/jour) entre l'âge de 4 et 12 semaines, ce qui correspond à la phase accélérée de développement de l'hypertension. L'effet de l'entraînement physique sur l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que la protéine kinase B (PKB) et Bcl-2, et les protéines pro-apoptotiques telles que Bax et la glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) a été examiné. L'activité de l'enzyme cytochrome c du muscle plantaire et l'expression de la protéine de stress HSP-72 dans le myocarde furent augmentées suggérant un effet positif de l'entraînement physique. Cependant, l'entraînement n'a pas atténuée la progression de l'élévation de la pression sanguine ou augmenter substantiellement l'hypertrophie cardiaque. L'entraînement physique a favorisé la phosphorylation des résidus Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸ de PKB dans le ventricule gauche et ceci fut corrélé à l'augmentation de la phosphorylation de GSK-3 et au contenu en glycogène. L'entraînement physique était associé à une augmentation de l'expression de la sous-unité régulatrice p85 α de la protéine phosphatidylinositol 3-kinase, ce qui pourrait avoir contribué à l'amélioration de la phosphorylation de PKB/GSK-3. L'augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2 dans le ventricule gauche était aussi associée à une augmentation de l'expression de la protéine Bax. Collectivement, ces données démontre que l'entraînement physique exerce des effets favorables sur les adaptations cellulaires du myocarde des rats SHR, et ce, malgré une absence d'effets sur la pression sanguine.

Summary

Exercise training could potentially exert a protective effect on the signaling events associated with cardiac cell apoptosis. In the setting of hypertension such a mechanism could have important clinical implications. In this regard, spontaneously hypertensive rats (SHR) were trained 5 days/wk on a treadmill (18 m/min for 120 min/day) between the ages of 4 and 12 wk, corresponding to the hypertensive accelerating phase. The effect of exercise training on the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and protein kinase B (PKB), and the apoptotic proteins Bax and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) were examined. A training effect was observed as shown by the elevated cytochrome oxidase c activity in the plantaris muscle. Training did not however attenuate the progressive rise of blood pressure or affect cardiac hypertrophy. In cardiac lysates isolated from left ventricles of exercised SHR, PKB phosphorylation of both Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸ residues was significantly increased and correlated to GSK-3 β phosphorylation. Exercise training was associated with the increased expression of the phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit p85 α , which may have in part have contributed to the improved status of PKB. HSP-72 and Bcl-2 protein expression was increased in the left ventricle of exercised SHR, and associated with a concomitant increased expression of the protein Bax. Thus the Bcl-2/Bax ratio was not changed with exercise training, suggesting that the anti-apoptotic mechanism was effective to compensate the increase in the expression of the pro-apoptotic protein Bax in the myocardium of the SHR.

Introduction

Exercise training is recognized as a useful nonpharmacological intervention to reduce blood pressure in hypertension. Results from several studies show an average blood pressure reduction with training of 11 mmHg, ranging from 5-25 mmHg for systolic pressure, and of 8 mmHg, ranging from 3-15 mmHg, for diastolic pressure in various mammalian species (for reviews see (19; 45)). Reduction of blood pressure with exercise training is not observed in every individual with hypertension and is usually not sufficient to render a normotensive state (19). However, other protective mechanisms beneficial for the heart could also be associated with exercise training in hypertensive mammalian. For example, exercise stimulates capillary growth (8) and decreased myocardial oxygen consumption for a given workload in trained spontaneously hypertensive rats (SHR) (15). In the SHR, exercise training also prevented the disproportional growth of mitochondria and myofibrils that typify left ventricular hypertrophy, by ensuring sufficient mitochondrial development (9). The latter is important, since mitochondria is a major site for the apoptotic cascade.

Apoptosis has been suggested to play a maladaptive role in cardiac remodeling during the accelerated phase of hypertension development and during the transition to heart failure in the SHR (28; 29). Proteins involved in the regulation of apoptosis include heat shock protein 72 (HSP-72) and proteins of the Bcl-2 family. Among the latter, the anti-apoptotic Bcl-2 and the pro-apoptotic Bax are important regulators of mitochondrial function in cardiac myocyte apoptosis of the SHR (14). HSP-72 has been shown to

protect cardiac cells against apoptosis by preventing the nuclear accumulation of GSK-3 β and possibly, over-expression of Bax protein (5; 22; 22; 33; 44; 44).

The SHR heart is resistant to insulin (7; 39) and cardiac myocytes deprived of glucose have been shown to activate the mitochondrial apoptotic pathway (3). It is well known that insulin sensitivity is increased with endurance exercise training in those with hypertension (7; 10; 11). To our knowledge, the effect of exercise training on the phosphorylation response of two important key kinases, involved in insulin resistance and apoptosis, the serine/threonine kinase protein kinase B (PKB) and the glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), in the hypertensive rat heart is unknown. In another rat model, the sedentary Zucker diabetic fatty (ZDF) rats, phosphorylation level of both residues of PKB and GSK-3 β in the left ventricle has been shown to be significantly decreased, with exercise training partially restoring phosphorylation (26). PKB has been shown to inhibit the apoptotic cascade (18; 25; 25), to stimulate the uptake of glucose and amino acids, protein synthesis and to promote the inactivation of GSK-3 (20). GSK-3 is an important downstream target of PKB and its phosphorylation and subsequent inactivation will promote glycogen synthesis and provides an alternative anti-apoptotic mechanism (38; 43). GSK-3 has been also shown to be inactivated by insulin and treadmill running in the rat skeletal muscle (31).

Because blood pressure starts to rise sharply at around 4 wk of age in SHR animals, we hypothesized that beginning an exercise training protocol at this age should cause marked effects on blood pressure and cardiac function, as well as on proteins

related to insulin signaling and apoptosis. Since pro-apoptotic proteins have been identified in the SHR model as a critical modulator of maladaptive cardiac remodeling, the following study examined the effect of exercise training on the status of the myocardial PKB/GSK-3 pathway, the regulation of the anti-apoptotic elements HSP-72, BCL-2, and the apoptotic protein Bax.

Methods

Animals

All protocols were approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal and were in accordance with the Canadian guidelines for the use and care of laboratory animals. Fourteen genetically spontaneously hypertensive male rats (SHR; 3 weeks of age) were separated into 2 groups; exercise (SHR Exe, n = 8) and sedentary (SHR Sed, n = 6). The accelerated phase of hypertension in the SHR model has previously been to occur between 4 and 9 weeks of age, with established hypertension at 13 weeks of age (13).

Exercise-training regimen. SHR were trained 5 days/wk on a treadmill for 8 weeks, beginning at 4 weeks of age. Training speed and duration were progressively increased until a final setting of 18 m/min, 0° slope for 120-min/day. A long duration exercise protocol was chosen because of its potential to alter the glycogen content in the heart and thus to affect PKB/GSK-3 phosphorylation. To take into account the stress associated with handling and treadmill noise, the control animals were placed near the treadmill during the exercise sessions.

Weekly blood pressure (BP) measurement. Resting caudal artery systolic BP was recorded weekly from week 2 to week 8 of the exercise training protocol in unanesthetized rats, using the tailcuff method (Harvard NIBP, Holliston, MA). Three BP tracings were recorded, averaged, and expressed as mean value. Three additional measurements were performed 1-, 3- and 12-hours post exercise during the fifth week of training to examine the acute effect of a training session on BP.

Measurement of left ventricular function and mean arterial pressure. Fourty eight hours after the last training session, rats were anesthetized with ketamine-xylazine (61,6 and 7,7 mg/kg respectively) and were intubated with a rodent ventilator (Model 683; Harvard, Holliston, MA) at a frequency of 60 breaths/min (2,5 ml /breath). Left ventricular hemodynamics (+dP/dt, -dP/dt, systolic and diastolic pressures) were measured by a microtip pressure transducer catheter (model SPR-407, 2F, Millar instrument, Houston Texas), as previously described (34). Systolic and diastolic arterial pressures were measured in the carotid artery prior to entry into the left ventricle. Following hemodynamic measurements, blood samples were collected, and the heart subsequently removed and separated into the left and right ventricle. The ventricles were weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Skeletal muscle cytochrome c oxidase and cardiac glycogen content. Glycogen concentration in the left ventricle was determined spectrophotometrically using sulfuric acid as described by Lo and al. (30). Plantaris muscle cytochrome oxidase activity

(pCOX) was assessed to verify the effect of training. pCOX was obtained by monitoring the reaction kinetics spectrophotometrically as described by Smith (42).

Homogenization and sample preparation

The left ventricle was pulverized in a mortar cooled with liquid nitrogen, and subsequently transferred to a lysis buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH 7.4, 1% triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, protease inhibitors (0.5 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin), phosphatase inhibitors (100 µM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride) and re-homogenized. Lysates were subsequently centrifuged at 12 000 g, 4°C, for 10 min to remove insoluble material. The supernatant was removed, and protein content was determined by the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Western blot

Left ventricular lysate (100-200 µg of protein) was loaded onto a 10% acrylamide gel and separated overnight at 4°C. The samples were simultaneously electrotransferred to polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) and visualized by Ponceau S stain to confirm successful transfer and equal sample loading. Membranes were blocked with 5% BSA (phosphorylated PKB and GSK-3 antibodies) or 5% skim milk (HSP 72, Bax, Bcl-2, PKB, p85α antibodies) in Tris-buffered saline + Tween 20 (TBST; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.1 % Tween 20). All washes were done in TBST. Antibodies employed detected either phosphorylated PKB Thr³⁰⁸, PKB Ser⁴⁷³ or GSK-3β (1:1000; New England Biolabs, Beverly, MA), HSP 72 (1:15000; Stressgen, Victoria, BC), Bax (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Bcl-2 (1:500; Santa Cruz

Biotechnology), p85 α (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) or PKB protein (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Following incubation, the membranes were washed with TBST, subjected to the appropriate secondary antibody conjugated to horse radish peroxidase (1:10,000) for 1-2 hrs at room temperature, and the bands subsequently detected by autoradiography utilizing the ECL detection kit (Amersham Ltd, Piscataway, NJ). Films were quantified using a flatbed scanner and Scion image (Scion Corp., Frederick, MD).

Statistics

All data are expressed as mean \pm SEM. Changes in protein expression and phosphorylation are presented as fold increase versus sedentary SHR. Data were analyzed by a one-way ANOVA followed by Newman Keuls post-hoc test for weekly blood pressure measurement. Group-to-group comparison was performed by a Student's t test. Correlations were assessed by a Pearson product-moment test. Results were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Blood pressure and left ventricular function. Systolic and diastolic blood pressure as measured by the tail cuff method sharply rose before week 6 (age 10 weeks) of the training protocol and subsequently stabilized in the SHR rat. The training regimen had no effect on the rise of blood pressure in the SHR as measured by the tail cuff method (Figure 1). By contrast, systolic and diastolic pressures measured via the Millar catheter in the anaesthetized rat were higher in the exercised SHR rats at the end of the training

regimen, as compared to the sedentary SHR (Table 1). Heart rate and the maximal rates of pressure development (+dP/dt) and relaxation (-dP/dt) were not significantly different between sedentary and exercised SHR rats (Table 1). Despite the lack of a chronic effect of exercise on lowering MAP in the SHR, an important acute effect was observed. Post-exercise blood pressure, measured during the fifth week of training, was significantly reduced at 3 and 12 hours following a single bout of treadmill running (Figure 2).

Changes in heart and plantaris muscle weights, skeletal muscle cytochrome oxidase activity and cardiac glycogen content following exercise. The heart weight of exercised SHR was not increased but heart weight body weight ratio (HW/BW) was significantly higher, as compared to sedentary SHR (Table 1). Likewise, the plantaris muscle weight of exercised SHR was not increased and the plantaris weight to body weight (P/BW) ratio was significantly higher (Table 1). Plantaris muscle cytochrome oxidase activity was enhanced significantly by exercise in SHR, showing an effect of training. Myocardial glycogen was decreased by 39% in the trained animals, as compared to the sedentary SHR (Table 1).

The effect of exercise on p85 α expression, phosphorylation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 β in the left ventricle of the SHR. The enzyme phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) represents a putative upstream activator of PKB. Treadmill training influenced this signaling pathway as expression of the p85 α regulatory subunit of PI3-K in the left ventricle (LV) was significantly elevated by 97% and PKB phosphorylation of the residues Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸ was increased by 166% and

120% respectively, as compared to the sedentary SHR (Figure 3). This effect of exercise on phosphorylation was associated with a very small increase in total PKB protein content (Figure 3). The phosphorylation of GSK-3 β Ser⁹, an important downstream target of PKB was variable and not significantly increased in the exercised SHR, as compared to the sedentary SHR. Nevertheless, GSK-3 β Ser⁹ phosphorylation significantly correlated with PKB Thr³⁰⁸ and PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation ($r=0.60$ and 0.58 respectively).

The effect of exercise on Bcl-2/Bax and HSP 72 protein expression in the left ventricle of the SHR. Bax expression increased by 91% in the trained SHR, as compared to the sedentary SHR, while Bcl-2 protein expression was increased by 106% (Figure 5). The Bcl-2/Bax ratio of exercised SHR was not significantly different from that of sedentary SHR. Lastly, exercise significantly increased HSP-72 protein expression in the exercised SHR, as compared to the sedentary control (Figure 6).

Discussion

Because blood pressure starts to rise sharply at around 4 weeks of age in SHR animals, we hypothesized that beginning an exercise training protocol at this age should affect blood pressure and many proteins related to mitochondrial function and cell survival in the heart. Moreover, we chose a long duration treadmill protocol for its potential to strain the myocardium in an attempt to reach a higher level of adaptation and protein expression. In the present study, a long duration training protocol starting in the accelerated phase of hypertension development in the SHR did not decrease blood pressure. On the contrary, it increased it further, as measured by a microtip pressure transducer catheter under anesthesia. It is well known that endurance exercise training decreases blood pressure in patients with hypertension (19). The blood pressure response to exercise training reported in the literature for the SHR is however variable. These differences between studies may be related to several factors including differences in training intensity, duration, mode (45), stress (27) and environment (50). Several investigators have reported in SHR a significant increase in blood pressure, or a trend towards it, following treadmill, swimming or voluntary wheels running (16; 23; 47), while others did not find any significant differences (8; 41). By contrast, several authors have reported that low-intensity exercise training on a treadmill decreased systolic, diastolic and mean arterial pressure in the SHR rat as measured by direct or indirect methods (46; 46; 49). In comparison to the present study, the latter employed a similar treadmill training speed, but a shorter duration of exercise. One possibility is that stress associated with training could account for part of the increased blood pressure. It has for instance been demonstrated that foot shock increased the reactivity of blood pressure in

the SHR (27). However, in this study, blood pressure measured with the tail cuff method over weeks in the SHR rats did not differ significantly between groups.. Additionally, use of foot shock was very limited, and restricted to the first weeks of training. We cannot exclude that anesthesia may have altered specifically the blood pressure response in exercised SHR rats when measured directly but it would be surprising. Therefore duration of exercise might indeed explain the blood pressure response in the present study.

However, with the present protocol, acute beneficial effects of exercise may still persist. Indeed, blood pressure was significantly reduced 3 and 12 hours following a single exercise bout, suggesting that this type of exercise was an effective stimulus for acute blood pressure reduction, despite the increase in chronic blood pressure.

Left ventricular indices of contractility were not significantly changed in the exercised SHR, as compared to sedentary SHR. Consequently, chronic treadmill running did not exert an effect on cardiac function in the SHR model despite evidence of successful exercise training as indicated by increased plantaris COX activity. It has been shown that exercise training has a plethora of favorable effects on cardiac function, on mitochondria content and on glucose homeostasis (6; 9; 15; 15; 17). In the present study, the phosphorylation status of PKB was improved in the exercised SHR and this may have improved the kinase activity (1). This effect may have been attributed at least in part to the increased protein expression of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase p85 α , an upstream activator of PKB. Alternatively, increased PKB

phosphorylation could also be attributable in part to the reduced glycogen content observed in the exercised SHR heart, as previous studies have demonstrated that high glycogen content inhibited PKB activity (12; 24; 35). Phosphorylation of PKB residues correlated with GSK-3 β Ser⁹ phosphorylation, despite the fact that the latter did not change significantly with exercise training. A disparate pattern of GSK-3 isoforms phosphorylation has been previously demonstrated in the human vastus lateralis following exercise (51).

Because apoptosis has been suggested to play a maladaptive role in cardiac remodeling in the SHR during the accelerated phase of hypertension (29) and during the transition to heart failure (28), we measured the protein expression of Bax and Bcl-2 after exercise training. The ratio of heterodimer formation between the anti-apoptotic protein Bcl-2 and Bax has been shown to be reduced in the myocardium of the SHR, suggesting a greater homodimer formation of Bax leading to apoptosis (14; 37). In the present study, exercise training did not modify the Bcl-2/Bax ratio, but surprisingly, Bax expression was increased in the exercised SHR heart in concomitance with an increase in Bcl-2 protein expression as compared to controls. The latter may support the notion of a compensatory mechanism dampening the formation of Bax homodimers, and allowing maintenance of the Bcl-2/Bax ratio despite the increase in MAP. The increase in Bax protein expression in the exercised SHR myocardium could be related to the increased workload consequent to a chronically elevated blood pressure. Indeed it is tempting to speculate that glycogen content was not replenished 24 hours after the last exercise bout, since it was still significantly reduced 48 hours later. To complete 120 min of treadmill

running with a reduced glycogen content may have been stressful for the SHR heart. Vander Heiden and al. (48) found that glucose limitation resulted in Bax translocation. In this study we do not know if the increase in Bax expression was associated with the movement of Bax from the cytosol to mitochondria. Nevertheless, the overexpression of Bcl-2 is still a protective mechanism, as it prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane (32) even in the absence of Bax translocation (40).

HSPs have been proposed to act against apoptosis by a mechanism independent of Bcl-2. Hsp70 prevents stress-induced apoptosis by blocking the caspase proteolytic cascade (44) (2). HSP-72 represents an alternative PKB-independent anti-apoptotic pathway via the inhibition of nuclear GSK-3 β accumulation (4; 22). A previous study has demonstrated an increased mRNA expression of HSP-72 in the myocardium of normotensive rat following exercise training (36). Consistent with that observation, HSP-72 protein expression was increased in the exercised SHR. The underlying mechanisms of the increased expression of HSP-72 in the exercised myocardium remain undefined. However, this upregulation further supports the premise that training favors the recruitment of anti-apoptotic signaling events which could improve cardiac remodeling.

Conclusion

In summary, the findings of the present study suggest that exercise training was associated with the recruitment of multiple anti-apoptotic signaling events, including PKB and HSP-72 in the myocardium of the SHR. Exercise training did not increase the Bcl-2/Bax ratio, because the apoptotic protein Bax was increased in concomitance to the

increase in Bcl-2 protein expression. The improved status of PKB phosphorylation and Bcl-2 protein expression may have nonetheless contributed to an improvement against pro-apoptotic stimulus in the exercised SHR. Collectively; these phenotypic changes suggest a favorable pattern of cardiac remodeling, despite the absence of a decrease in blood pressure progression during the accelerating phase of hypertension in the SHR.

List of figures

Fig 1 Effect of exercise on blood pressure as assessed by the tail-cuff method. * Significantly different, $p < 0.05$, from week 8. Results are average \pm SEM.

Fig 2 Effect of exercise on blood pressure at 1, 3 and 12 hours post-exercise as assessed by the tail-cuff method. * Significantly different, $p < 0.05$, from exercised SHR (n=8). Results are average \pm SEM.

Fig 3 Effect of exercise on PKB phosphorylation in the sedentary (Sed; n=6) and exercised (Exe; n=8) SHR rats. (A) Western blot of PKB protein expression, PKB Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³ phosphorylation. (B) Fold increase versus Sed SHR, results are average \pm SEM. * significantly different $p < 0.05$.

Fig 4 Effect of exercise on p85 α protein expression in the sedentary (Sed; n=6) and exercised (Exe; n=8) SHR rats. (A) Western blots of p85 α protein expression. (B) Fold increase versus Sed SHR, results are average \pm SEM. * significantly different $p < 0.01$.

Fig 5 Effect of exercise on Bcl-2 and Bax protein expression in sedentary (Sed; n=5) and exercised (Exe; n=7) SHR rats. (A) Western blot of Bax and Bcl-2 protein expression (B) Fold increase versus SHR Sed, results are average \pm SEM. * significantly different $p < 0.001$.

Fig 6 Effect of exercise on HSP-72 protein expression in sedentary (Sed; n=6) and exercised (Exe; n=8) SHR rats. (A) Western blot of HSP-72 protein expression. (B) Fold increase versus SHR Sed, results are average \pm SEM. * significantly different $p < 0.001$.

Acknowledgements

Dr. A. Calderone is a Chercheur-Boursier Senior of the Fonds de Recherche en Santé du Québec. We thank Dr. Jacques de Champlain for generously providing support for the tail-cuff measurements. The expert technical assistance of Robert Clément from the Montreal Heart Institute was greatly appreciated.

Table 1
Functional and morphological data at sacrifice.

	SHR Exercise	SHR Sedentary
Body weight (g)	247.6 ± 13.3	249.1 ± 6.7
HW (g)	1.0 ± 0.05	0.95 ± 0.04
HW/BW (mg/g)	4.0 ± 0.14*	3.81 ± 0.17
vGlycogen (µg/mg)	4.4 ± 0.6*	7.2 ± 1.2
pCOX (µM/g/min)	1.9 ± 0.2*	0.5 ± 0.07
Plantaris	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.004
Plantaris/BW	0.91 ± 0.04*	0.84 ± 0.02
Heart rate (Bpm)	261 ± 15.8	274 ± 16.0
Systolic pressure	205.9 ± 21.5*	169.3 ± 16.6
Diastolic pressure	132.1 ± 8.4*	113.4 ± 9.1
Mean arterial pressure	156.7 ± 12.6*	132.0 ± 11.5
LVSP	178.3 ± 25.8	161.7 ± 18.7
+dP/dt	9224 ± 1133	7839 ± 1395
-dP/dt	8286 ± 1708	7505 ± 1459

* Significant difference between Exercise SHR (n=8) and Sedentary SHR (n=6) $p < 0.05$; Results are average ± SD. HW (heart weight); HW/BW (heart weight to body weight ratio); vGlycogen (left ventricular glycogen content); pCOX (plantaris cytochrome oxidase activity); LVSP (left ventricular systolic pressure); +dP/dt (left ventricular index of contractility) and -dP/dt (left ventricular index of relaxation).

Reference List

1. **Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA.** Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO* 15: 6541-6551, 1996.
2. **Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM and Green DR.** Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2: 469-475, 2000.
3. **Bialik S, Cryns VL, Drincic A, Miyata S, Wollowick AL, Srinivasan A and Kitsis RN.** The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes. *Circ Res* 85: 403-414, 1999.
4. **Bijur GN and Jope RS.** Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of HSF-1 activity. *J Neurochem* 75: 2401-2408, 2000.
5. **Bijur GN and Jope RS.** Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 276: 37436-37442, 2001.

6. **Burgess ML, Buggy J, Price RL, Abel FL, Terracio L, Samarel AM and Borg TK.** Exercise and hypertension-induced collagen changes are related to left ventricular function in rat hearts. *Am J Physiol* 270: H151-H159, 1996.
7. **Bursztyrn M, Ben Ishay D, Shochina M, Mekler J and Raz I.** Disparate effects of exercise training on glucose tolerance and insulin levels and on ambulatory blood pressure in hypertensive patients. *J Hypertens* 11: 1121-1125, 1993.
8. **Crisman RP, Rittman B and Tomanek RJ.** Exercise-induced myocardial capillary growth in the spontaneously hypertensive rat. *Microvasc Res* 30: 185-194, 1985.
9. **Crisman RP and Tomanek RJ.** Exercise training modifies myocardial mitochondria and myofibril growth in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 248: H8-H14, 1985.
10. **Dengel DR, Galecki AT, Hagberg JM and Pratley RE.** The independent and combined effects of weight loss and aerobic exercise on blood pressure and oral glucose tolerance in older men. *Am J Hypertens* 11: 1405-1412, 1998.
11. **Dengel DR, Hagberg JM, Pratley RE, Rogus EM and Goldberg AP.** Improvements in blood pressure, glucose metabolism, and lipoprotein lipids after aerobic exercise plus weight loss in obese, hypertensive middle-aged men. *Metabolism* 47: 1075-1082, 1998.

12. **Derave W, Hansen BF, Lund S, Kristiansen S and Richter EA.** Muscle glycogen content affects insulin-stimulated glucose transport and protein kinase B activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E947-E955, 2000.
13. **Evenwell R and Struyker-Boudier H.** Effect of physical training on the development of hypertension in the spontaneously hypertensive hypertensive rat. *Pflügers Archiv* 381: 19-24, 1979.
14. **Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC and Diez J.** Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. Effects of AT1 blockade with Losartan. *Hypertension* 32: 280-286, 1998.
15. **Friberg P, Hoffmann P, Nordlander M and Thoren P.** Effects of voluntary physical exercise on cardiac function and energetics in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 133: 495-500, 1988.
16. **Golden AL, Bright JM and Lawler JE.** Changes in creatine kinase expression induced by exercise in borderline hypertensive rat hearts. *Clin and exper hypertension* 16: 577-593, 1994.
17. **Goodwin GW and Taegtmeier H.** Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1490-H1501, 2000.

18. **Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Brooks Robey R and Hay N.** Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependant on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes and development* 15: 1406-1418, 2001.
19. **Hagberg JM, Park JJ and Brown MD.** The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. *Sports Med* 30: 193-206, 2000.
20. **Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA and Hundal HS.** Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47: 1006-1013, 1998.
21. **Hamet P, Kong D, Pravenec M, Kunes J, Kren V, Klir P, Sun YL and Tremblay J.** Restriction fragment length polymorphism of hsp70 gene, localized in the RT1 complex, is associated with hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 19: 611-614, 1992.
22. **He B, Meng YH and Mivechi NF.** Glycogen synthase kinase 3beta and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. *Mol Cell Biol* 18: 6624-6633, 1998.

23. **Higuchi M, Hashimoto I and Yamakawa K.** Effect of exercise training on aortic collagen content in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 53: 330-333, 1985.
24. **Kawanaka K, Nolte LA, Han DH, Hansen PA and Holloszy JO.** Mechanisms underlying impaired GLUT-4 translocation in glycogen- supercompensated muscles of exercised rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1311-E1318, 2000.
25. **Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK and Hay N.** Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 19: 5800-5810, 1999.
26. **Lajoie, C., Trudeau, F., Lavoie, N., Massicotte, G., Gagnon, S., Calderone, A., and Béliveau, L.** Exercise enhanced HSP72 expression and reversed protein kinase B dephosphorylation in the myocardium of Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Can.J.Applied Physiol.* 27 (Suppl.), 29-30. 2002 (Abstract).
27. **Lawler JE, Naylor SK, Abel MM and Baldwin DR.** A chronic high-salt diet fails to enhance blood pressure reactivity to a tone associated with footshock in SHR, BHR, and WKY rats. *Physiol Behav* 54: 941-946, 1993.

28. **Li Z, Bing OHL, Long X, Robinson KG and Lakatta EG.** Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 272: H2313-H2319, 1997.

29. **Liu JJ, Peng L, Bradeley CJ, Zulli A, Shen J and Buxton BF.** Increased apoptosis in the Heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovascular research* 45: 729-735, 2000.

30. **Lo S, Russell JC and Taylor AW.** Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236, 1970.

31. **Markuns JF, Wojtaszewski JF and Goodyear LJ.** Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanisms in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 274: 24896-24900, 1999.

32. **Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA and Saikumar P.** Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276: 18361-18374, 2001.

33. **Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C and Massie B.** Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 5317-5327, 1997.

34. **Nguyen QT, Cernacek P, Sirois MG, Calderone A, Lapointe N, Stewart DJ and Rouleau JL.** Long-Term Effects of Nonselective Endothelin A and B Receptor Antagonism in Postinfarction Rat: Importance of Timing. *Circulation* 104: 2075-2081, 2001.
35. **Nielsen JN, Vissing J, Wojtaszewski JF, Haller RG, Begum N and Richter EA.** Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1267-E1275, 2002.
36. **Noble EG, Moraska A, Mazzeo RS, Roth DA, Olsson MC, Moore RL and Fleshner M.** Differential expression of stress proteins in rat myocardium after wheel or treadmill run training. *J Appl Physiol* 86: 1696-1701, 1999.
37. **Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619, 1993.
38. **Pap M and Cooper GM.** Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphoinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273: 19929-19932, 1998.
39. **Paternostro G, Clarke K, Heath J, Seymour AM and Radda GK.** Decreased GLUT-4 mRNA content and insulin-sensitive deoxyglucose uptake show insulin resistance in the hypertensive rat heart. *Cardiovasc Res* 30: 205-211, 1995.

40. **Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM and Venkatachalam MA.** Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 17: 3401-3415, 1998.
41. **Sharma RM, Tomanek RJ and Bhalla RC.** Effect of swimming training on cardiac function and myosin ATPase activity in SHR. *J Appl Physiol* 59: 758-765, 1985.
42. **Smith L.** Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. edited by Wiley. New York: D. Glick, 1955, p. 427-434.
43. **Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE and Birnbaum MJ.** The role of glycogen synthase kinase 3B in insulin-stimulated glucose metabolism. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 25: 17934-17940, 1999.
44. **Suzuki K, Sawa Y, Kagisaki K, Taketani S, Ichikawa H, Kaneda Y and Matsuda H.** Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70. *Basic Res Cardiol* 95: 397-403, 2001.
45. **Tipton CM.** Exercise, training and hypertension: An update. *Exerc Sport Sci Rev* 19: 447-505, 1991.

46. **Tipton CM, Matthes RD, Marcus KD, Rowlett KA and Leininger JR.** Influences of exercise intensity, age, and medication on resting systolic blood pressure of SHR populations. *J Appl Physiol* 55: 1305-1310, 1983.
47. **Tomanek RJ, Gisolfi CV, Bauer CA and Palmer PJ.** Coronary vasodilator reserve, capillarity, and mitochondria in trained hypertensive rats. *J Appl Physiol* 64: 1179-1185, 1988.
48. **Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH and Thompson CB.** Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 21: 5899-5912, 2001.
49. **Véras-Silva AS, Mattos KC, Gava NS, Brum PC, Negrao CE and Krieger EM.** Low-intensity exercise training decrease cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 273: H2627-H2631, 1997.
50. **Vogt M, Ott B, Rupp H and Jacob R.** Significance of physical exercise in hypertension. Influence of water temperature and beta-blockade on blood pressure, degree of cardiac hypertrophy and cardiac function in swimming training of spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol* 81: 157-169, 1986.
51. **Wojtazewski JF, Nielsen P, Kiens B and Richter EA.** Regulation of glycogen synthase kinase-3 in human skeletal muscle: effects of food intake and bicycle exercise. *Diabetes* 50: 265-269, 2001.

Figure 1

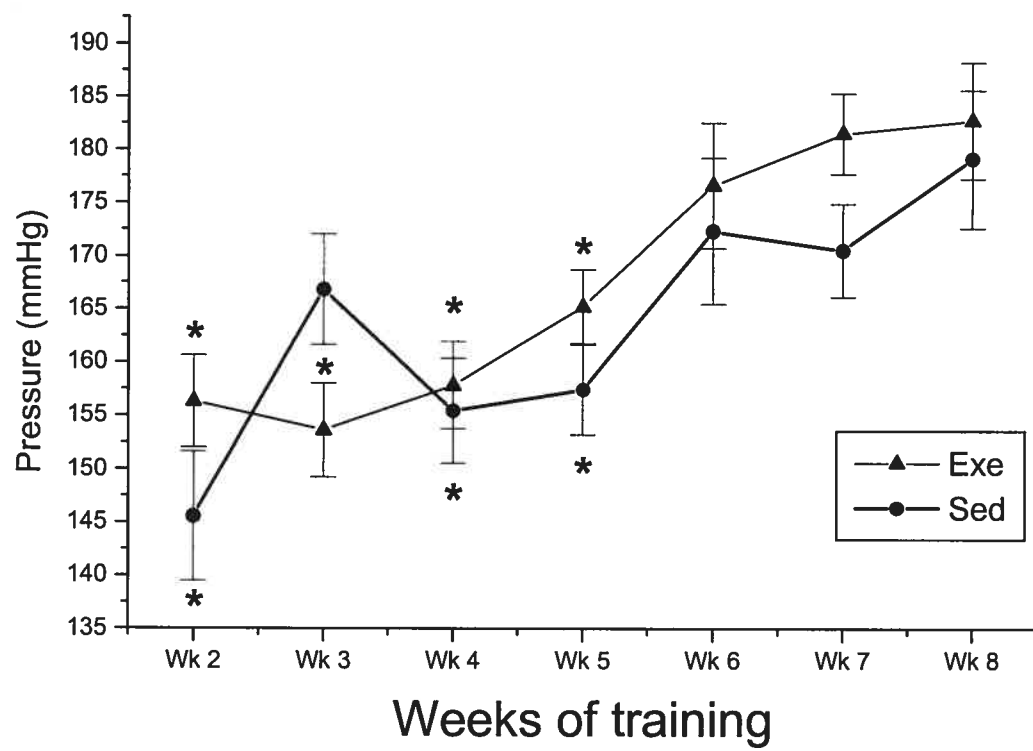


Figure 2

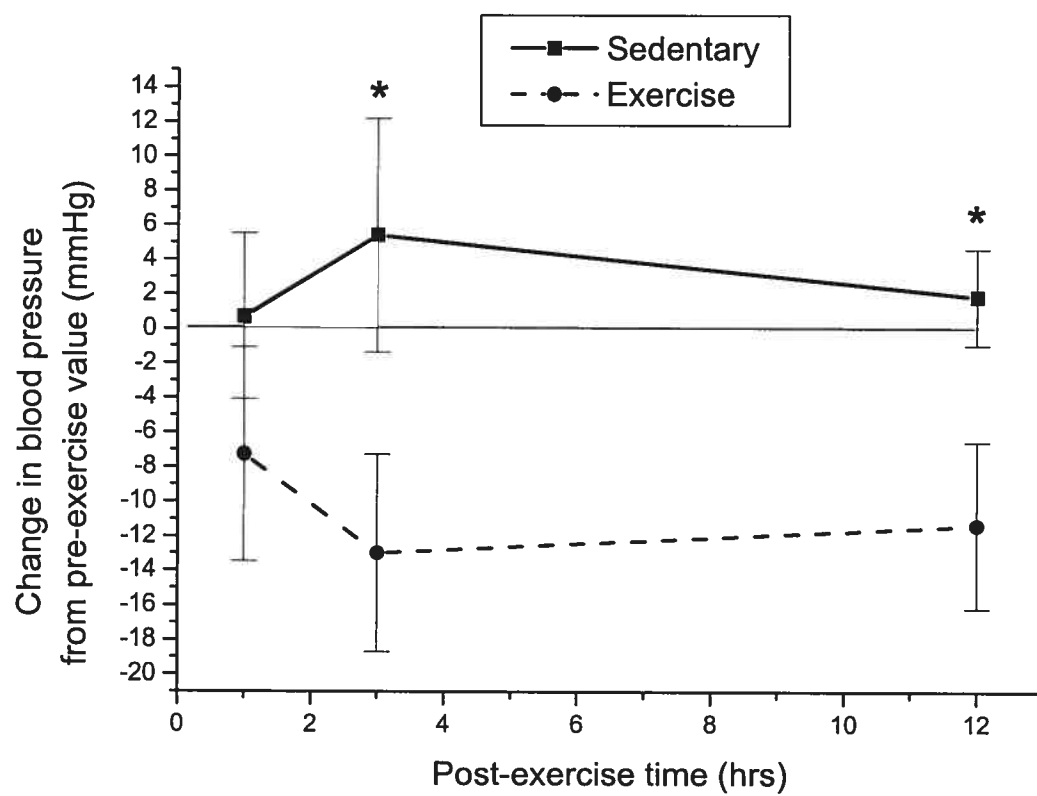
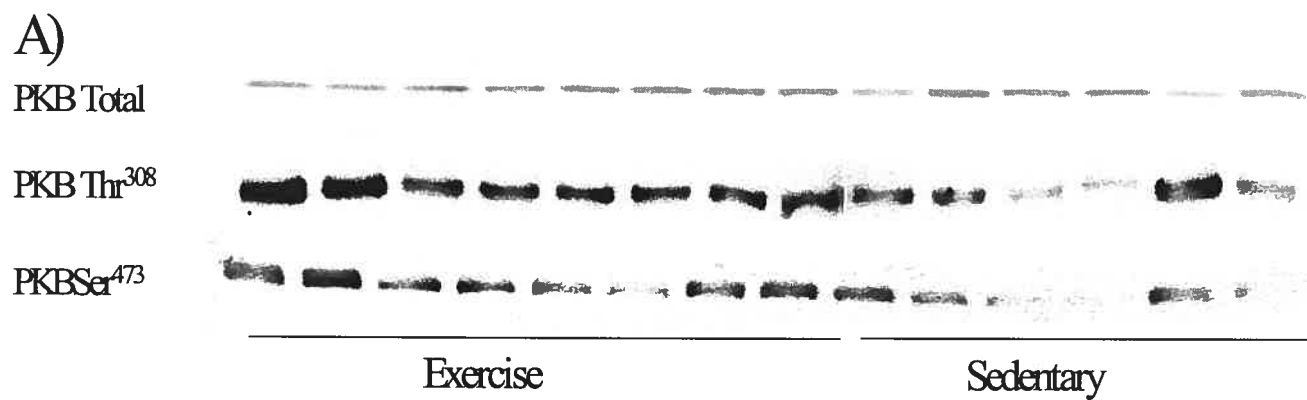


Figure 3



B)

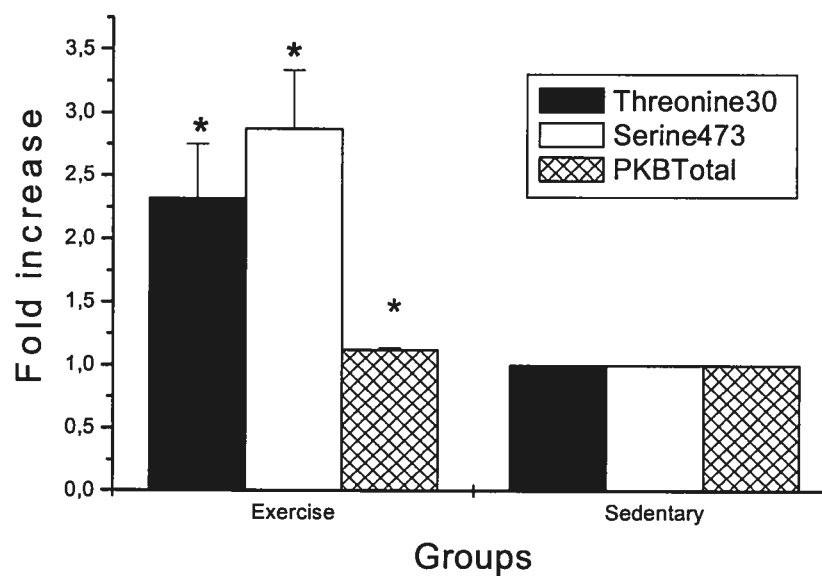


Figure 4

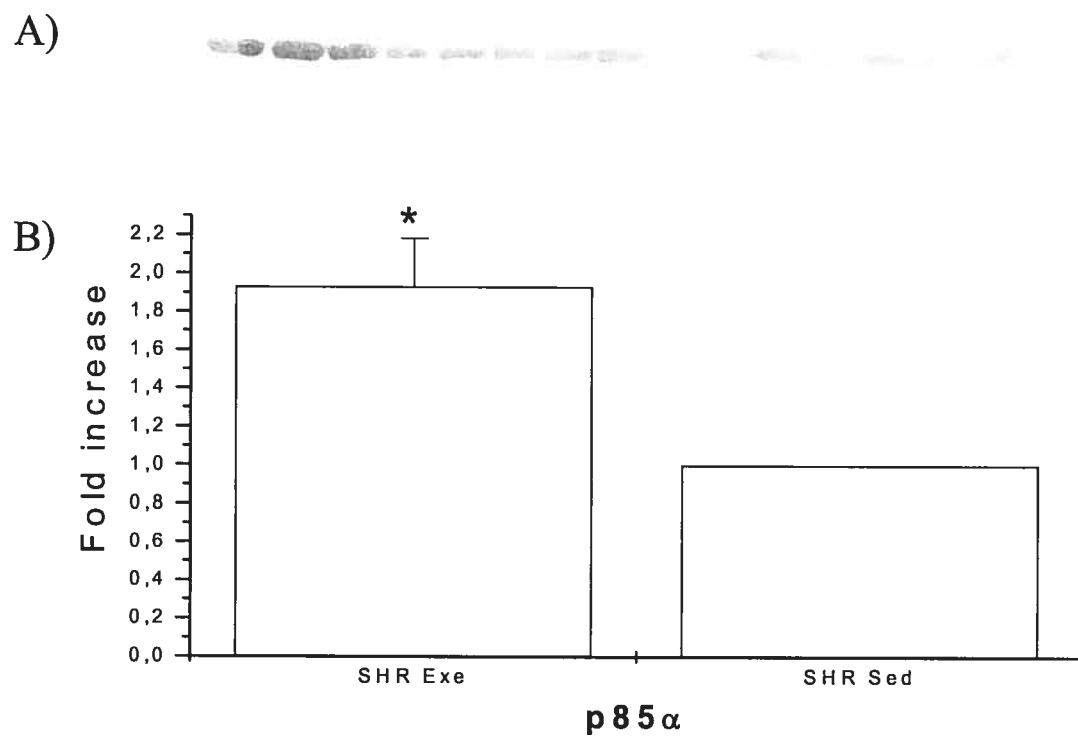
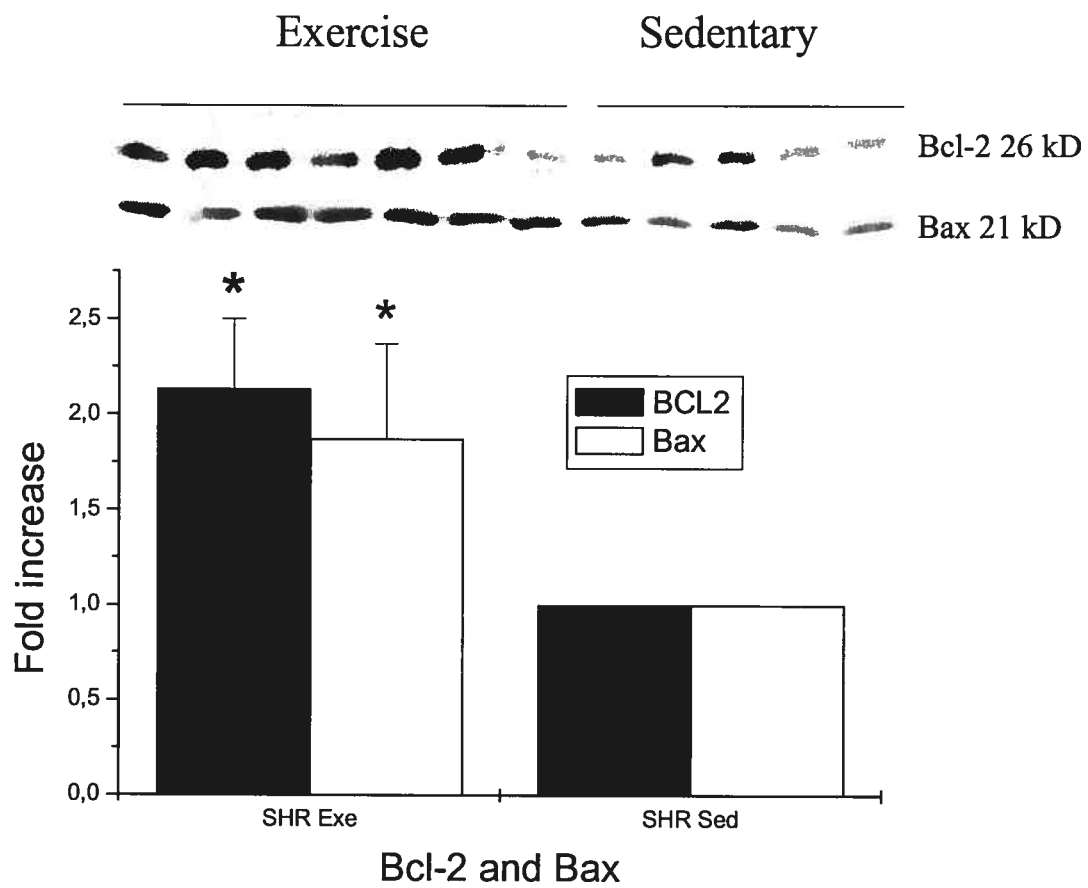


Figure 5



Chapitre 5

Discussion

Discussion générale

Les trois études présentées dans cette thèse avaient comme thème central la régulation de PKB et de GSK-3 dans le myocarde de rats manifestant une résistance à l'insuline. Un des objectifs principaux était ainsi de vérifier les effets potentiels de l'entraînement physique sur la régulation de PKB et de GSK-3 dans le myocarde d'animaux diabétiques ou hypertendus. Il est bien connu que l'exercice chronique maximise l'action de l'insuline, ce qui pourrait promouvoir un phénotype cardiaque spécifique et protecteur chez les mammifères atteints du diabète de *type 2* et d'hypertension. À notre connaissance, il s'agit des premières études évaluant les effets de l'entraînement physique sur la régulation des protéines cardiaques liées à la survie cellulaire chez des mammifères atteints de maladies chroniques reconnues pour altérer le cœur.

Les trois études ont été entreprises chez des modèles de rats connus pour manifester des complications cardiaques associées soit au diabète de *type 2* (ZDF) ou à l'hypertension (SHR). Nous avons choisi d'utiliser les rats ZDF et SHR parce qu'ils s'apparentent assez bien à l'humain en terme de progression du diabète de *type 2* (34) et de l'hypertension (55). Peu d'études ont été entreprises pour investiguer les complications cardiovasculaires chez ce type de rat. Les deux premières études de cette thèse ont été réalisées chez le rat ZDF à différents moments de la progression de la maladie, alors que la troisième l'a été avec le modèle de rat SHR, pendant la phase accélérée de l'augmentation de la pression sanguine.

Homéostasie du glucose et régulation de PKB et de GSK-3 dans le myocarde diabétique et hypertendu

Dans les deux premières études, nous avons démontré que la régulation de l'enzyme PKB était altérée dans le cœur des rats ZDF hyperinsulinémiques/hyperglycémiques. Cela pourrait avoir un impact important sur l'activité maximale de l'enzyme et sur le rôle central que joue PKB sur l'homéostasie du glucose. La réduction de l'activité et/ou de la phosphorylation de PKB a déjà été observée dans le cœur et les muscles squelettiques de plusieurs autres modèles de rats insulino-résistant et patients atteints du diabète de *type 2* (85; 92; 108; 109; 112; 165), mais pas chez le rat ZDF. Nous avons aussi observé, dans la première étude, que lorsque les animaux développaient l'hyperglycémie rapidement, plutôt que tardivement, cette situation était caractérisée par une augmentation marquée de la phosphorylation du résidu Thr³⁰⁸ de PKB en concomitance avec une déphosphorylation du résidu Ser⁴⁷³ dans le ventricule gauche. Cette dissociation de la phosphorylation des deux résidus de PKB en réduirait l'activité (107). Une régulation similaire de PKB a déjà été rapportée dans des cœurs de rat traité à la STZ (112). Les auteurs de cette dernière étude observent que la réduction de la phosphorylation du résidu Ser⁴⁷³ de PKB était associée à une concentration en insuline qui avait tendance à être plus faible que chez les rats contrôles. Lorsqu'ils infusaient une dose supra-physiologique d'insuline la phosphorylation du résidu Ser⁴⁷³ revenait à la normale et la phosphorylation du résidu Thr³⁰⁸ augmentait d'environ 5 fois par rapport au groupe contrôle. En comparaison, dans notre première étude, nous observons une insulinémie à l'état basal qui était 3 à 4 fois plus importante que dans le groupe contrôle. Ceci suggère que la voie signalétique de l'insuline soit altérée par un mécanisme qui affecterait de façon spécifique le résidu Ser⁴⁷³ et/ou que le

contenu plasmatique en insuline n'était pas assez important pour maintenir la phosphorylation de PKB. Plusieurs mécanismes sont susceptibles d'altérer de façon indépendante la phosphorylation des deux résidus de PKB. Ainsi, la production de céramide (169), l'ILK (124; 152) et la protéine kinase C α/β (PKC α/β) (107) agiraient spécifiquement sur le résidu Ser⁴⁷³, tandis que les stress osmotiques (31) et la staurosporine (87) inactiverait PKB par déphosphorylation du résidu Thr³⁰⁸ sans affecter le résidu Ser⁴⁷³. Soltys et al. (177) ont démontré que le palmitate diminue la phosphorylation et l'activité de PKB et de GSK-3 en présence d'insuline. Le palmitate inhiberait l'action de l'insuline, ce qui diminuerait la captation du glucose, la glycolyse et l'oxydation du glucose par un mécanisme qui serait dépendant de PKB (177). D'ailleurs, l'oxydation du palmitate est augmentée dans le cœur de souris diabétique db/db (1). Par contre, il ne faut pas exclure la possibilité que d'autres acides gras ou lipides intracellulaires puissent agir de façon similaire au palmitate dans le cœur. En effet, le contenu en TG's est augmenté de 50% dans le cœur de rat résistant à l'insuline et l'accumulation de TG's cardiaques serait associée à une réduction de l'effet de l'insuline pour stimuler le métabolisme des glucides (11). Dans les deux premières études, les rats ZDF n'ont pas été contrôlés au niveau de la prise calorifique, puisqu'ils étaient tous nourris *ad libitum*. Il est connu que le niveau plasmatique d'AGL's est élevé chez le rat ZDF (114) et il est possible que les rats ZDF des deux premières études aient eu un apport excessif en lipides. Un apport excessif en nutriments chez le rat ZDF pourrait affecter la régulation de PKB et de GSK-3 dans le cœur. En effet, Tremblay et al. (194; 195) ont observé des altérations au niveau de l'activité de PKB et de la phosphorylation

de GSK-3 β dans le muscle squelettique de rats sujets à une diète riche en lipides lorsque stimulé par l'insuline.

L'augmentation de la phosphorylation du résidu Thr³⁰⁸ de PKB que nous avons observé dans le cœur des rats ZDF pourrait être la conséquence d'une augmentation de l'enzyme PDK-1 ou, alternativement, une différente expression et/ou activité d'une phosphatase spécifique au résidu Thr³⁰⁸ (169). À la lumière de nos recherches et des études répertoriées, il semble que l'insuline aurait un effet important et plus spécifique sur le résidu Thr³⁰⁸ de PKB, alors que le résidu Ser⁴⁷³ serait régulé par plusieurs mécanismes complexes, incluant l'insuline. Compte tenu de la pléiade d'effets de PKB dans la cellule, il n'est pas surprenant que sa régulation soit complexe et finement modulée.

Dans la deuxième étude, les rats ZDF manifestaient plus sévèrement le diabète, puisque à cette âge, il a été démontré que les cellules bêta du pancréas ne répondent plus aussi bien au taux élevé de glucose, occasionnant une réduction de la sécrétion et du niveau plasmatique de l'insuline (35). De plus, plusieurs rats ZDF démontraient des cataractes aux yeux. Cet état sévère du diabète refléterait la progression naturelle des complications du diabète de *type 2* vers un diabète similaire au diabète de *type 1* rencontré chez l'humain. Il est intéressant de comparer l'étude citée précédemment utilisant des rats traités à la STZ (112) avec notre deuxième étude, puisque les rats ZDF y ont une insuliniémie beaucoup plus faible. Les auteurs ont démontré qu'une dose importante d'insuline améliore la phosphorylation des deux résidus de PKB, suggérant ainsi que la voie PI3-K est fonctionnelle en amont de PKB. Fait important, dans notre

seconde étude, l'entraînement des rats ZDF a significativement fait augmenter la concentration plasmatique d'insuline et rétabli la phosphorylation des résidus Thr³⁰⁸ et Ser⁴⁷³ de PKB. Il est connu que l'exercice chronique favoriserait l'augmentation de la masse des cellules β pancréatique et de leur contenu en insuline et la concentration plasmatique d'insuline chez les humains et les rats atteints du diabète de *type 2* (110; 171). Aussi, une solution contenant du glucose et de l'insuline augmente significativement la phosphorylation de PKB et de GSK-3 en comparaison à une solution qui contient seulement du glucose dans des cœurs de rat isolés (177). Ainsi, il est fort probable que l'amélioration de la phosphorylation de PKB et de GSK-3 observée chez les rats ZDF soit attribuable à l'augmentation de l'insulinémie. Le lien entre cette augmentation de la concentration plasmatique d'insuline et une amélioration de la réponse du récepteur à insuline et de la phosphorylation de PKB n'a pas été investigué. Par contre, dans la troisième étude présentée dans cette thèse, nous avons observé une augmentation de l'expression de la sous-unité p85 α de PI3-K par l'entraînement chez le rat SHR, ce qui pourrait favoriser la propagation du signal de l'insuline vers PKB. Ce phénomène semble en partie spécifique aux effets de l'exercice chronique sur le cœur, puisque dans l'étude des rats traités à la STZ de Laviola et al. (112), la transplantation d'îlots pancréatiques n'a pas eu d'effet sur l'expression de p85 α malgré une amélioration de la phosphorylation des résidues PKB. Aussi, il faut interpréter avec prudence l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de la sous-unité p85 α de PI3-K par l'entraînement améliore la phosphorylation de PKB, puisqu'il a été démontré que p85 pourrait jouer un rôle négatif sur l'activation d'éléments signalétiques en aval de PI3-kinase (127; 197; 198).

L'amélioration de la phosphorylation des résidus de PKB dans le myocarde des rats ZDF exercés pourrait aussi être attribuable à des mécanismes liés à la réduction de la glycémie par l'insuline. Il a été démontré qu'en normalisant la glycémie, la phosphorylation et l'activité de PKB retournent à un niveau normal (141). Une baisse significative de la glycémie et une amélioration de la phosphorylation de PKB a été observée dans le cœur de rat traité à la STZ, suite à la transplantation d'îlots pancréatiques (112). Un entraînement de 6 semaines à la nage augmenterait la phosphorylation du résidu Ser⁴⁷³ de PKB et l'expression du GLUT-4 dans le muscle squelettique suite à une infusion d'insuline (123). De plus, il a été démontré que le contenu protéique en GLUT-4 à la membrane plasmique augmentait de 32% en réponse à une hyper-insulinémie, de 35% en réponse à l'exercice seulement et de 44% en combinant l'insuline et l'exercice (191). L'amélioration de l'insulinémie des rats ZDF entraînés de notre étude, pourrait hypothétiquement privilégier la captation en glucose dans les tissus périphériques, en particulier les muscles squelettiques, ce qui favoriserait une diminution de la glycémie. Ainsi, le cœur serait exposé à une glycémie plus faible. Cette réduction pourrait limiter le stockage excessif en glycogène observé dans le cœur des rats ZDF exercés. D'ailleurs, il a déjà été démontré que l'entraînement d'intensité modéré réduisait la synthèse du glycogène dans le muscle squelettique de rats diabétiques récupérant d'un exercice prolongé (80). Cette réduction du contenu en glycogène par l'exercice pourrait favoriser l'augmentation de la phosphorylation de PKB par un mécanisme de rétroaction (52; 138; 139; 162). En effet, nous avons observé que l'amélioration de la phosphorylation des résidus de PKB était corrélée ($r = -0,65$) à la réduction du

contenu en glycogène suite à l'entraînement dans le cœur des rats ZDF et ce, malgré une augmentation significative de l'insulinémie. Cette réduction du contenu en glycogène pourrait être importante pour le cœur des rats ZDF, parce qu'il est reconnu que le cœur diabétique accumule du glycogène (32) et qu'une accumulation en glycogène est généralement associée au développement de la résistance à l'insuline (96; 102). À l'inverse de l'hyperglycémie, un contenu élevé en glycogène pourrait altérer le transport et l'entrée du glucose dans la cellule afin de prévenir une accumulation excessive de glycogène. D'ailleurs, chez le rat Zucker résistant à l'insuline, l'expression du GLUT-4 est réduite dans le myocarde (175), la translocation du GLUT-4 à la membrane plasmique dans le cœur de rat est altérée lorsque stimulée par l'insuline et le tout serait accompagné d'une diminution de la phosphorylation de PKB (93). À la lumière de nos recherches et des études répertoriées dans la littérature, une idée intéressante est que PKB agirait comme interrupteur métabolique pour limiter l'entrée du glucose lorsque le contenu en glycogène est excessif, surtout lorsque les besoins de la cellule sont faibles. En résumé, l'entraînement physique chez les rats diabétique de *type 2* pourrait être bénéfique à plusieurs niveaux; augmentation de l'insulinémie, réduction de la glycémie, utilisation accrue du glycogène favoriserait la phosphorylation de PKB favorisant l'entrée du glucose pour réduire la glycémie et protéger le myocarde contre l'apoptose.

Paradoxalement, l'entraînement à la nage a de façon inattendue réduit la phosphorylation du résidu Thr³⁰⁸ de PKB dans le cœur des rats contrôles, sans toutefois modifier la phosphorylation du résidu Ser⁴⁷³ de PKB. De façon similaire, la

déphosphorylation de la Thr³⁰⁸ a été observée *in vitro* dans des cellules en culture de type TF-1 et ce, sans changement de l'état de phosphorylation de la Ser⁴⁷³ (169). L'activité de PKB dans le cœur des rats contrôle exercés pourrait être diminuée, mais probablement pas au même niveau que les rats ZDF, puisque la phosphorylation des deux résidus de PKB était réduite. L'entraînement physique pourrait avoir contribué à maintenir l'homéostasie du glucose, malgré la déphosphorylation de PKB Thr³⁰⁸, par un mécanisme indépendant de l'action de l'insuline. Par exemple, la translocation du GLUT-4 à la membrane cellulaire pour l'entrée du glucose dans la cellule serait favorisée par la contraction musculaire en utilisant des mécanismes indépendants de l'action de l'insuline (73; 82). La modulation de la phosphorylation du résidu Thr³⁰⁸ de PKB par l'entraînement pourrait partiellement être expliquée par l'amélioration du contenu en insuline et/ou la contraction des cardiomyocytes observées chez les rats contrôles et ZDF exercés de la deuxième étude.

Une tendance générale ressort de nos études sur l'exercice. Nous observons que plus le contenu en glycogène diminue, plus la phosphorylation du résidu serine⁴⁷³ de PKB et GSK-3 β est augmentée et ce de façon indépendante au niveau d'insuline plasmique. Il est possible que d'autres molécules et stimuli soient spécifiquement activés par l'exercice. Par exemple, l'insuline n'activerait que modérément PKB dans le muscle squelettique de souris n'exprimant pas de récepteur à l'insuline, alors que l'addition de l'exercice peut améliorer de façon plus marquée l'activité de PKB (73; 209). La phosphorylation de PKB serait augmentée de 640% en réponse à l'insuline, de 280% par l'exercice et de 1000% pour l'exercice combiné à l'insuline (191). Les

mécanismes sous-jacents à l'amélioration de la régulation de PKB et à l'homéostasie du glucose par un effet indépendant de l'exercice demeurent des perspectives de recherches importantes pour le cœur normal, diabétique et hypertendu.

Dans la deuxième étude, nous avons aussi démontré que la phosphorylation de GSK-3 α était réduite dans le myocarde des rats ZDF sédentaires, suggérant une augmentation de l'activité de GSK-3 α , de concert avec la diminution de la phosphorylation de PKB. Par contre, cette dernière observation semble inconsistante avec le contenu élevé en glycogène dans le ventricule gauche des rats sédentaire ZDF. Une augmentation de l'activité de GSK-3 devrait décroître l'activité enzymatique de la glycogène synthase (GS) et la synthèse du glycogène (43). Il a été démontré que la phosphorylation de GSK-3 α/β serait aussi altérée dans le cœur de rat traité à la STZ (112). Par contre, ces derniers auteurs ont rapporté que l'augmentation de la phosphorylation de PKB par l'insuline n'avait pas d'effet sur la phosphorylation de GSK-3 α/β . Ceci contraste avec notre étude, puisque l'entraînement a augmenté le contenu en insuline et la phosphorylation de PKB, tout en restaurant partiellement la phosphorylation de GSK-3 α . De plus, dans la troisième étude, nous avons aussi observé une amélioration de la phosphorylation de GSK-3 β dans le cœur des rats SHR, et ceci était aussi de concert avec la réduction du contenu en glycogène et l'amélioration de la phosphorylation de PKB. Ce paradoxe pourrait s'expliquer par la proposition que le glycogène serait un meilleur régulateur que l'insuline pour activer la glycogène synthase (138). Il est possible qu'un contenu élevé en glycogène puisse agir comme régulateur de la GS (157) et de la GSK-3 pour prévenir une accumulation

excessive. D'ailleurs, nous avons observé dans la deuxième étude une corrélation négative entre la concentration en glycogène et la phosphorylation de GSK-3 ($r = -0,57$; $P < 0,05$).

Hypertrophie cardiaque et régulation de PKB et GSK-3 chez le rat diabétique et hypertendu.

Normalement, l'insuline favorise un bilan azote positif (48; 48; 70) et l'ablation spécifique du récepteur à insuline du muscle cardiaque résulterait en une réduction de la grosseur des myocytes. Ainsi, le diabète et l'hypertension sont en général associés à de l'hypertrophie cardiaque (67; 101; 101). Dans notre première étude, les rats ZDF étaient tous hyper-insulinémiques et nous n'avons pas observé d'hypertrophie cardiaque. De plus, la croissance du cœur n'était pas proportionnelle à la croissance du corps chez les rats ZDF, ce qui est habituellement le cas chez l'humain (46) et ce, malgré une importante phosphorylation de PKB Thr³⁰⁸ et de GSK-3. Dans la deuxième et la troisième étude, l'exercice chronique a eu pour effet d'augmenter et/ou de rétablir la phosphorylation de PKB et de GSK-3 β , sans toutefois induire d'hypertrophie cardiaque chez les rats ZDF et SHR. Par contre, nous observons que l'exercice chronique a augmenté le ratio poids du cœur sur le poids du corps (HW/BW) et la phosphorylation ventriculaire de GSK-3 β chez les rats contrôles exercés de la deuxième étude et chez les rats SHR. Cette augmentation de la phosphorylation de GSK-3 β pourrait avoir favorisé la croissance et/ou le maintien de la masse cardiaque par rapport à leur poids corporel, puisque l'inactivation de GSK-3 β est requise pour que les cardiomyocytes puissent

s'hypertrophier (81). Par contre, cette augmentation de GSK-3 β n'était pas associée à une augmentation de la phosphorylation de l'isoforme GSK-3 α .

L'insuline active PKB et l'augmentation de l'activité de PKB promouvoit la transcription de c-myc, un gène qui répond rapidement à un stimulus hypertrophique et à la progression du cycle cellulaire (3). De plus, PKB stimule l'augmentation du niveau de cyclin D1 dans le noyau cellulaire en induisant la translocation nucléaire et la traduction de l'ARNm, ce qui pourrait favoriser l'hypertrophie cardiaque (99). Afin de mieux comprendre pourquoi le cœur des rats ZDF ne s'hypertrophie pas davantage en présence de stimuli reconnus pour favoriser l'hypertrophie, nous avons mesuré un indicateur de la prolifération cellulaire nommé proliferating cell nuclear antigen (PCNA). PCNA est une molécule qui régularise la réplication de l'ADN et sert de marqueur pour la progression du cycle cellulaire dans le cœur humain (16; 29). Nous avons observé que le cœur diabétique semble éprouver des difficultés au niveau de la prolifération cellulaire, puisque que l'expression de PCNA était réduite dans le cœur des rats ZDF qui ont développé une hyperglycémie tardive.

Régulation des protéines liées à la survie cellulaire chez le rat diabétique et hypertendu.

La protection myocardique serait réduite dans le cœur des rats ZDF, puisque les mécanismes de survie cellulaire sont souvent dépendants d'un apport énergétique en glucides et PKB ne peut protéger la cellule en absence de glucose. Dans la première étude, il est fort possible que la protection cellulaire ait été rapidement

réduite dans le cœur diabétique qui faisait face à une élévation rapide et importante de la glycémie. Cette augmentation rapide de la glycémie pourrait expliquer la diminution du ratio de Bcl-2/Bax qui pourrait provoquer un affaiblissement de la protection cellulaire. L'hyperglycémie promouvoient la génération d'intermédiaires intracellulaires qui sont réactifs à l'oxygène et qui pourraient perturber le potentiel transmembranaire de la mitochondrie et activer l'apoptose. Le ratio Bcl-2/Bax serait amélioré en administrant de l'IGF-1 à des cellules mésangiales incubées dans une concentration élevée de glucose, ce qui inhiberait l'apoptose occasionné par le stress oxydatif, en augmentant la phosphorylation et l'inactivation de Bad par PKB (100). Il est aussi possible que les processus d'adaptation physiologiques pour contrer la surcharge rapide en glucides nécessitent un certain délai de temps pour que la transcription des protéines liées à la survie cellulaire soit couplée à l'envergure du stress. Les rats ZDF qui ont développé une hyperglycémie plus tardive et une élévation plus importante de l'insulinémie auraient bénéficié d'une meilleure protection cellulaire en maintenant un meilleur ratio Bcl-2/Bax. Par contre, la réduction de l'expression de la protéine PKB chez les rats ZDF de la première étude et la déphosphorylation de PKB et GSK-3 chez les rats ZDF sédentaire de la deuxième étude pourrait réduire la protection cellulaire. Aussi, l'amélioration de la phosphorylation de PKB/GSK-3 par l'entraînement favoriserait la survie cellulaire chez les rats SHR et ZDF, parce que la phosphorylation et l'inactivation de GSK-3 bloqueraient l'apoptose in vitro (148). Dans la troisième étude, l'entraînement a augmenté l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax dans le cœur des rats SHR. Par contre, les processus de défense cellulaire ont probablement favorisé l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui

privilégierait le maintien d'un ratio Bcl-2/Bax neutre. Cette observation est importante, puisque le ratio Bcl-2/Bax serait diminué dans le cœur des rats SHR et ceux-ci démontreraient une augmentation significative de l'apoptose qui serait dépendante de l'âge et de l'état du myocarde (64; 117; 118). L'entraînement physique a augmenté l'expression de la protéine de stress HSP-72 ce qui pourrait améliorer la protection du myocarde chez les rats ZDF, SHR et contrôles. L'augmentation de l'expression de HSP-72 pourrait par exemple améliorer la récupération mécanique après une ischémie, réduire l'étendue d'un infarctus et décroître l'apoptose du myocarde (94; 121; 136; 156; 186). L'amélioration de l'expression de HSP-72 pourrait être importante, puisqu'une étude antérieure a démontré que le contenu en ARNm de la protéine de stress serait réduite dans le muscle de patients atteints du diabète de *type 2* en plus d'être corrélé avec la résistance à l'insuline (111).

Conclusions

Pour conclure, les résultats de ces études pourront contribuer significativement à l'avancement de l'état actuel des connaissances en regard à la régulation de PKB et de GSK-3 par l'entraînement physique dans le cœur de rats diabétiques de *type 2* et hypertendus. En effet, la plupart des recherches sur les effets de l'exercice chronique et la signalisation de l'insuline ont été effectuées dans le muscle squelettique. Certaines indications nous permettent de croire que l'hyperglycémie et le contenu en glycogène sont d'importants modulateurs de la régulation de PKB et de GSK-3 dans le myocarde. Nous avons démontré que l'entraînement physique procure au myocarde de rats génétiquement diabétiques de *type 2* et hypertendus plusieurs avantages liés à

l'homéostasie du glucose et à la survie cellulaire. Une telle amélioration de la protection myocardique pourrait être importante pour les patients atteints du diabète de *type 2* et d'hypertension parce qu'ils sont résistants à l'insuline et plus susceptibles à d'importants problèmes cardiaques comme l'ischémie et l'apoptose. Finalement, plusieurs drogues sont présentement à l'essai pour moduler spécifiquement l'action de PKB et de GSK-3. Nous suggérons que les traitements visant PKB et GSK-3 devraient prendre en considération les effets bénéfiques de l'exercice chronique sur le myocarde diabétique et hypertendu.

Chapitre 6

Bibliographie

Bibliographie

1. Aasum E, Hafstad AD, Severson DL and Larsen TS. Age-dependent changes in metabolism, contractile function, and ischemic sensitivity in hearts from db/db mice. *Diabetes* 52: 434-441, 2003.
2. Abe T, Ohga Y, Tabayashi N, Kobayashi S, Sakata S, Misawa H, Tsuji T, Kohzuki H, Suga H, Taniguchi S and Takaki M. Left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus model rats. *Am J Physiol* 282: H138-H148, 2002.
3. Ahmed NN, Grimes HL, Bellacosa A, Chan TO and Tschlis PN. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3627-3632, 1997.
4. Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T, Zhu W, Nagai R and Komuro I. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation* 102: 2873-2879, 2000.
5. Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Al Majali KM, Trembling PM, Mann CJ, Shoulders CC, Graf D, St Lezin E, Kurtz TW, Kren V, Pravenec M, Ibrahimi A, Abumrad NA, Stanton LW and Scott J.

- Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 21: 76-83, 1999.
6. Aitman TJ, Gotoda T, Evans AL, Imrie H, Heath KE, Trembling PM, Truman H, Wallace CA, Rahman A, Dore C, Flint J, Kren V, Zidek V, Kurtz TW, Pravenec M and Scott J. Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet* 16: 197-201, 1997.
 7. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO* 15: 6541-6551, 1996.
 8. Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM and Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of Protein kinase B. *J Biol Chem* 272: 31515-31524, 1997.
 9. Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, Richardson JA, Hill JA and Olson EN. Activated glycogen synthase-3beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 99: 907-912, 2002.
 10. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F and Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J* 22: 4385-4399, 2003.

11. Atkinson LL, Kozak R, Kelly SE, Onay BA, Russell JC and Lopaschuk GD. Potential mechanisms and consequences of cardiac triacylglycerol accumulation in insulin-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E923-E930, 2003.
12. Batist G, Mersereau W, Malashenko BA and Chiu RC. Response to ischemia-reperfusion injury in hypertrophic heart. Role of free-radical metabolic pathways. *Circulation* 80: III10-III13, 1989.
13. Beauloye C, Marsin AS, Bertrand L, Vanoverschelde JL, Rider MH and Hue L. The stimulation of heart glycolysis by increased workload does not require AMP-activated protein kinase but a wortmannin-sensitive mechanism. *FEBS Lett* 531: 324-328, 2002.
14. Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh TC and Millhorn DE. Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells. *Cell Signal* 13: 23-27, 2001.
15. Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeier H, Severson D, Kahn CR and Abel ED. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 109: 629-639, 2002.
16. Beltrami CA, Di Loreto C, Finato N, Rocco M, Artico D, Cigola E, Gambert SR, Olivetti G, Kajstura J and Anversa P. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA),

- DNA synthesis and mitosis in myocytes following cardiac transplantation in man. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2789-2802, 1997.
17. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Kansara M and Rudert F. CD95 (Fas/Apo-1)-induced apoptosis results in loss of glucose transporter function. *J Immunol* 156: 4092-4099, 1996.
 18. Bijur GN and Jope RS. Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 276: 37436-37442, 2001.
 19. Brady MJ and Saltiel AR. The role of protein phosphatase-1 in insulin action. *Recent Prog Horm Res* 56: 157-173, 2001.
 20. Brar BK, Stephanou A, Knight R and Latchman DS. Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34: 483-492, 2002).
 21. Brar BK, Stephanou A, Pennica D and Latchman DS. CT-1 mediated cardioprotection against ischaemic re-oxygenation injury is mediated by PI3 kinase, Akt and MEK1/2 pathways. *Cytokine* 16: 93-96, 2001.

22. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J and Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868, 1999.
23. Burgering BM and Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376: 599-602, 1995.
24. Burgess ML, Buggy J, Price RL, Abel FL, Terracio L, Samarel AM and Borg TK. Exercise and hypertension-induced collagen changes are related to left ventricular function in rat hearts. *Am J Physiol* 270: H151-H159, 1996.
25. Burszty M, Ben Ishay D and Gutman A. Insulin resistance in spontaneously hypertensive rats but not in deoxycorticosterone-salt or renal vascular hypertension. *J Hypertens* 10: 137-142, 1992.
26. Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N and Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84: 215-222, 2002.
27. Candido R, Forbes JM, Thomas MC, Thallas V, Dean RG, Burns WC, Tikellis C, Ritchie RH, Twigg SM, Cooper ME and Burrell LM. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res* 92: 785-792, 2003.

28. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S and Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321, 1998.
29. Chang CD, Ottavio L, Travali S, Lipson KE and Baserga R. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene. *Mol Cell Biol* 10: 3289-3296, 1990.
30. Chatam, J. C., Forder, J. R., and McNeil, J. H. The heart in diabetes. (Editors). 1996. Norwell, MA, Kluwer Academic. Serial (Book, Monograph).
31. Chen D, Fucini RV, Olson AL, Hemmings BA and Pessin JE. Osmotic shock inhibits insulin signaling by maintaining Akt/protein kinase B in an inactive dephosphorylated state. *Mol Cell Biol* 19: 4684-4694, 1999.
32. Chen V and Ianuzzo CD. Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Can J Physiol Pharmacol* 60: 1251-1256, 1982.
33. Cho H, Mu J, Kim J, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw III EB, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI and Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 292: 1728-1731, 2001.

34. Clark JB, Palmer CJ and Shaw WN. The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 173: 68-75, 1983.
35. Cockburn BN, Ostrega DM, Sturis J, Kubstrup C, Polonsky KS and Bell GI. Changes in pancreatic islet glucokinase and hexokinase activities with increasing age, obesity, and the onset of diabetes. *Diabetes* 46: 1434-1439, 1997.
36. Coffey PJ, Jing J and Woodgett JR. Protein kinase B (c-AKT): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 335: 1-13, 1998.
37. Coffey PJ and Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein- serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 201: 475-481, 1991.
38. Compagno V, Di L, I, Cestelli A and Donatelli M. Effect of aging and hypertension on beta-myosin heavy chain in heart of spontaneously hypertensive rats. *Int J Mol Med* 7: 507-508, 2001.
39. Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, Russo MA, Gu Y, Dalton N, Chung C, Latronico MV, Napoli C, Sadoshima J, Croce CM and Ross J, Jr. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12333-12338, 2002.

40. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG and Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 91: 161-170, 1995.
41. Cook, S. A., Sugden, P. H., and Clerk, A. Regulation of Bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes. Association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circulation research* 85, 940-949. 1999.
42. Crisman RP and Tomanek RJ. Exercise training modifies myocardial mitochondria and myofibril growth in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 248: H8-H14, 1985.
43. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M and Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789, 1995.
44. Datta SR, Brunet A and Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes and development* 13: 2905-2927, 1999.
45. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241, 1997.

46. de Simone G, Daniels SR, Devereux RB, Meyer RA, Roman MJ, de Divitiis O and Alderman MH. Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults: assessment of allometric relations and impact of overweight. *J Am Coll Cardiol* 20: 1251-1260, 1992.
47. Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J and Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci* 95: 11211-11216, 1998.
48. Demartino GN and Ordway GA. Ubiquitin-proteasome pathway of intracellular protein degradation: Implication for muscle atrophy during unloading. *Exerc Sport Sci Rev* 26: 219-252, 1998.
49. Depre C, Hase M, Gaussin V, Zajac A, Wang L, Hittinger L, Ghaleh B, Yu X, Kudej RK, Wagner T, Sadoshima J and Vatner SF. H11 kinase is a novel mediator of myocardial hypertrophy in vivo. *Circ Res* 91: 1007-1014, 2002.
50. Depre C, Rider MH, Veitch K and Hue L. Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of heart glycolysis. *J Biol Chem* 268: 13274-13279, 1993.
51. Depre, C. and Taegtmeier, H. Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart. *Cardiovascular research* 45, 538-548. 2000.

52. Derave W, Hansen BF, Lund S, Kristiansen S and Richter EA. Muscle glycogen content affects insulin-stimulated glucose transport and protein kinase B activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E947-E955, 2000.
53. Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, King LM, Radda GK and Clarke K. Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovascular research* 61: 288-296, 2004.
54. Dirks AJ and Leeuwenburgh C. Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 27-39, 2004.
55. Doggrell SA and Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 39: 89-105, 1998.
56. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF and Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103: 253-259, 1999.
57. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR and Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661-665, 1997.

58. Eguchi Y, Shimizu S and Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57: 1835-1840, 1997.
59. Evenwell R and Struyker-Boudier H. Effect of physical training on the development of hypertension in the spontaneously hypertensive hypertensive rat. *Pflügers Archiv* 381: 19-24, 1979.
60. Fein, F. S., Kornstein, L. B., Strobeck, J. E., Capasso, J. M., and Sonnenblick, E. H. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circulation research* 47(6), 922-933. 1980.
61. Ferri KF and Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3: E255-E263, 2001.
62. Feuvray D, Idell-Wenger JA and Neely JR. Effects of ischemia on rat myocardial function and metabolism in diabetes. *Circ Res* 44: 322-329, 1979.
63. Filippa N, Sable CL, Filloux C, Hemmings B and Van Obberghen E. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4989-5000, 1999.
64. Fortunato MA, Ravassa S, Etayo JC and Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. Effects of AT1 blockade with Losartan. *Hypertension* 32: 280-286, 1998.

65. Frame S and Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery (review article). *Biochem J* 359: 1-16, 2001.
66. Friberg P, Hoffmann P, Nordlander M and Thoren P. Effects of voluntary physical exercise on cardiac function and energetics in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 133: 495-500, 1988.
67. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B and Anversa P. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 87: 1123-1132, 2000.
68. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN and Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101: 660-667, 2000.
69. Garland JM and Halestrap A. Energy metabolism during apoptosis. Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by stabilizing a form of metabolic arrest. *J Biol Chem* 272: 4680-4688, 1997.

70. Gelfand, R. A. and Barrett, E. J. Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. *J. of Clin. Invest.* 80(1), 1-6. 1987.
71. Gingras AC, Kennedy SG, O'Leary MA, Sonenberg N and Hay N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 12: 502-513, 1998.
72. Goldberg AL. Influence of insulin and contractile activity on muscle size and protein balance. *Diabetes* 28: 18-24, 1979.
73. Goodyear LJ, King PA, Hirshman MF, Thompson CM, Horton ED and Horton ES. Contractile activity increases plasma membrane glucose transporters in absence of insulin. *Am J Physiol* 258: E667-E672, 1990.
74. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Brooks Robey R and Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependant on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes and development* 15: 1406-1418, 2001.
75. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF and Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274, 1999.

76. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K and Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339: 229-234, 1998.
77. Hagberg JM, Park JJ and Brown MD. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. *Sports Med* 30: 193-206, 2000.
78. Hajduch E, Alessi DR, Hemmings BA and Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47: 1006-1013, 1998.
79. Hajri T, Ibrahim A, Coburn CT, Knapp FF, Jr., Kurtz T, Pravenec M and Abumrad NA. Defective Fatty Acid Uptake in the Spontaneously Hypertensive Rat Is a Primary Determinant of Altered Glucose Metabolism, Hyperinsulinemia, and Myocardial Hypertrophy. *J Biol Chem* 276: 23661-23666, 2001.
80. Hamilton N, Noble EG and Ianuzzo CD. Glycogen repletion in different skeletal muscles from diabetic rats. *Am J Physiol* 247: E740-E746, 1984.
81. Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A, Molkenin JD, Alessandrini A, Woodgett JR, Hajjar RJ, Michael A and Force T. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 151: 117-129, 2001.

82. Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW and Goodyear LJ. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47: 1369-1373, 1998.
83. He B, Meng YH and Mivechi NF. Glycogen synthase kinase 3beta and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. *Mol Cell Biol* 18: 6624-6633, 1998.
84. Hetman, M., Cavanaugh, J. E., Kimelman, D., and Xia, Z. Role of glycogen synthase kinase-3 beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *Journal of Neuroscience* 20(7), 2567-2574. 2000.
85. Hevener AL, Reichart D and Olefsky J. Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action in the obese Zucker fatty rat. *Diabetes* 49: 2154-2159, 2000.
86. Higuchi M, Miyagi K, Nakasone J and Sakanashi M. Role of high glycogen in underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine. *J Cardiovasc Pharmacol* 26: 899-907, 1995.
87. Hill MM, Andjelkovic M, Brazil DP, Ferrari S, Fabbro D and Hemmings BA. Insulin-stimulated protein kinase b on ser-473 is independent of its activity and

- occurs through a staurosporine-insensitive kinase. *J. biol. chem.* 276: 25643-25646, 2001.
88. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M and Kroemer G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 15: 1573-1581, 1997.
89. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD and Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348: 334-336, 1990.
90. Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T and Imahori K. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2719-2723, 1996.
91. Hu FB, Stampfer MJ, Solomon C, Liu S, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC and Manson JE. Physical activity and risk for cardiovascular events in diabetic women. *Ann Intern Med* 134: 96-105, 2001.
92. Huisamen B, Donthi RV and Lochner A. Insulin in combination with vanadate stimulates glucose transport in isolated cardiomyocytes from obese Zucker rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 15: 445-452, 2001.

93. Huisamen B, vanZyl M, Keyser A and Lochner A. The effects of insulin and b-adrenergic stimulation on glucose transport, glut4 and PKB activation in the myocardium of lean and obese non-insulin dependent diabetes mellitus rats. *Mol Cell Biochem* 223: 15-25, 2001.
94. Hutter MM, Sievers RE, Barbosa V and Wolfe CL. Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Circulation* 89: 355-360, 1994.
95. Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB and Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 16: 3693-3704, 1997.
96. Jensen J, Aslesen R, Ivy JL and Brors O. Role of glycogen concentration and epinephrine on glucose uptake in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol* 272: E649-E655, 1997.
97. Jonassen AK, Sack MN, Mjos OD and Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circulation research* 89: 1191-1198, 2001.
98. Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D and Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 95: 4997-5002, 1998.

99. Kandel ES and Hay N. The regulation and activities of the multifunctional Serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp cell research* 253: 210-229, 1999.
100. Kang BP, Urbonas A, Baddoo A, Baskin S, Malhotra A and Meggs LG. IGF-1 inhibits the mitochondrial apoptosis program in mesangial cells exposed to high glucose. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1013-F1024, 2003.
101. Kannel WB. Blood pressure as a cardiovascular risk factor. *JAMA* 275: 1571-1576, 1996.
102. Kawanaka K, Nolte LA, Han DH, Hansen PA and Holloszy JO. Mechanisms underlying impaired GLUT-4 translocation in glycogen- supercompensated muscles of exercised rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1311-E1318, 2000.
103. Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK and Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 19: 5800-5810, 1999.
104. Kobayashi K and Neely JR. Effects of increased cardiac work on pyruvate dehydrogenase activity in hearts from diabetic animals. *J Mol Cell Cardiol* 15: 347-357, 1983.

105. Kolter, T., Uphues, I., Wichelhaus'A., Reinauer, H., and Eckel, J. Contraction-induced translocation of the glucose transporter GLUT4 in isolated ventricular cardiomyocytes. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 189 : 1207-1214, 1992.
106. Konishi, H., Matsuzaki, H., Motonari, T., Ono, Y., Tokunaga, C, Kuroda, S., and Kikkawa, U. Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 93: 7639-7643, 1996.
107. Kroner C, Eybrechts K and Akkerman JW. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem* 275: 27790-27798, 2000.
108. Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H and Zierath JR. Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes* 46: 2110-2114, 1997.
109. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR and Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 47: 1281-1286, 1998.
110. Krotkiewski M, Lonroth P, Mandroukas K, Wroblewski Z, Rebuffe-Scrive M, Holm G, Smith U and Bjorntorp P. The effects of physical training on insulin

- secretion and effectiveness and on glucose metabolism in obesity and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 28: 881-890, 1985.
111. Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L and Koranyi L. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes* 51: 1102-1109, 2002.
112. Laviola L, Belsanti G, Davalli AM, Napoli R, Perrini S, Weir GC, Giorgino R and Giorgino F. Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. *Diabetes* 50: 2709-2720, 2001.
113. Lawlor MA and Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Science* 114: 2903-2910, 2001.
114. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD and Unger RH. β -Cell Lipotoxicity in the Pathogenesis of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus of Obese Rats: Impairment in Adipocyte- β -Cell Relationships. *PNAS* 91: 10878-10882, 1994.
115. Lehto S, Ronnema T, Haffner SM, Pyorala K, Kallio V and Laakso M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. *Diabetes* 46: 1354-1359, 1997.

116. Leri A, Liu Y, Malhotra A, Li Q, Stiegler P, Claudio PP, Giordano A, Kajstura J, Hintze TH and Anversa P. Pacing-induced heart failure in dogs enhances the expression of p53 and p53-dependent genes in ventricular myocytes. *Circulation* 97: 194-203, 1998.
117. Li Z, Bing OHL, Long X, Robinson KG and Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 272: H2313-H2319, 1997.
118. Liu JJ, Peng L, Bradeley CJ, Zulli A, Shen J and Buxton BF. Increased apoptosis in the Heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovascular research* 45: 729-735, 2000.
119. Loberg RD, Vesely E and Brosius FC, III. Enhanced glycogen synthase kinase-3beta activity mediates hypoxia- induced apoptosis of vascular smooth muscle cells and is prevented by glucose transport and metabolism. *J. Biol. Chem.*277: 41667-41673, 2002.
120. Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Feild MR, Ianuzzo SE and Ianuzzo CD. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol* 268: C1387-C1394, 1995.

121. Locke M, Tanguay RM, Klabunde RE and Ianuzzo CD. Enhanced postischemic myocardial recovery following exercise induction of HSP 72. *Am J Physiol* 269: H320-H325, 1995.
122. Lopaschuk GD and Spafford M. Response of isolated working hearts to fatty acids and carnitine palmitoyltransferase I inhibition during reduction of coronary flow in acutely and chronically diabetic rats. *Circ Res* 65: 378-387, 1989.
123. Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carvalheira JB, Peres SB, Reis MA, Saad MJ, Boschero AC and Velloso LA. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *Eur J Endocrinol* 147: 149-157, 2002.
124. Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA and Hiles ID. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene* 18: 8024-8032, 1999.
125. Markuns JF, Wojtaszewski JF and Goodyear LJ. Insulin and exercise decrease glycogen synthase kinase-3 activity by different mechanisms in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 274: 24896-24900, 1999.
126. Marton A, Mihalik R, Bratincsak A, Adleff V, Petak I, Vegh M, Bauer PI and Krajcsi P. Apoptotic cell death induced by inhibitors of energy conservation--Bcl-

- 2 inhibits apoptosis downstream of a fall of ATP level. *Eur J Biochem* 250: 467-475, 1997.
127. Mauvais-Jarvis F, Ueki K, Fruman DA, Hirshman MF, Sakamoto K, Goodyear LJ, Iannacone M, Accili D, Cantley LC and Kahn CR. Reduced expression of the murine p85 {alpha} subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest* 109: 141-149, 2002.
128. McDonagh PF and Hokama JY. Microvascular perfusion and transport in the diabetic heart. *Microcirculation* 7: 163-181, 2000.
129. Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M and Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β *. *J Biol Chem* 272: 30491-30497, 1997.
130. Mizushige K, Yao L, Noma T, Kiyomoto H, Yu Y, Hosomi N, Ohmori K and Matsuo H. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insulin-resistant prediabetic stage of a *type II* diabetic rat model. *Circulation* 101: 907, 2000.
131. Mokhtar N, Lavoie JP, Rousseau-Migneron S and Nadeau A. Physical training reverses defect in mitochondrial energy production in heart of chronically diabetic rats. *Diabetes* 42: 682-687, 1993.

132. Moley KH and Mueckler MM. Glucose transport and apoptosis. *Apoptosis* 5: 99-105, 2000.
133. Morgan HE, Gordon EE, Kira Y, Chua HL, Russo LA, Peterson CJ, McDermott PJ and Watson PA. Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 49: 533-543, 1987.
134. Morisco C, Condorelli G, Orzi F, Vigliotta G, Di Grezia R, Beguinot F, Trimarco B and Lembo G. Insulin-stimulated cardiac glucose uptake is impaired in spontaneously hypertensive rats: role of early steps of insulin signalling. *J Hypertens* 18: 465-473, 2000.
135. Morisco C, Condorelli G, Orzi F, Vigliotta G, Di Grezia R, Beguinot F, Trimarco B and Lembo G. Insulin-stimulated cardiac glucose uptake is impaired in spontaneously hypertensive rats: role of early steps of insulin signalling. *J Hypertens* 18: 465-473, 2000.
136. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C and Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 5317-5327, 1997.
137. Moule SK, Welsh GI, Edgell NJ, Foulstone EJ, Proud CG and Denton RM. Regulation of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 by insulin and beta-adrenergic agonists in rat epididymal fat cells. Activation of protein kinase B

- by wortmannin-sensitive and -insensitive mechanisms. *J Biol Chem* 272: 7713-7719, 1997.
138. Nielsen JN, Derave W, Kristiansen S, Ralston E, Ploug T and Richter EA. Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content. *J Physiol* 531: 757-769, 2001.
139. Nielsen JN, Vissing J, Wojtaszewski JF, Haller RG, Begum N and Richter EA. Decreased insulin action in skeletal muscle from patients with McArdle's disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E1267-E1275, 2002.
140. O'Rahilly S. Diabetes in midlife: planting genetic time bombs. *Nat Med* 3: 1080-1081, 1997.
141. Oku A, Ueta K, Arakawa K, Ishihara K, Nawano M, Kuronuma Y, Matsumoto M, Saito A, Tsujihara K, Anai M, Asano T, Kanai Y and Endou H. T-1095, an inhibitor of renal Na⁺-glucose cotransporters, may provide a novel approach to treating diabetes. *Diabetes* 48: 1794-1800, 1999.
142. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC and Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336: 1131-1141, 1997.

143. Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert SR, Cigola E and Anversa P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 28: 2005-2016, 1996.
144. Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619, 1993.
145. Osborn BA, Daar JT, Laddaga RA, Romano FD and Paulson DJ. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. *J Appl Physiol* 82: 828-834, 1997.
146. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM and Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine- threonine kinase. *Nature* 401: 82-85, 1999.
147. Pap M and Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphoinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 273: 19929-19932, 1998.
148. Pap M and Cooper GM. Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22: 578-586, 2002.

149. Paulson, D. J. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. *Cardiovascular research* 34: 104-112, 1997.
150. Paulson DJ, Kopp SJ, Peace DG and Tow JP. Improved postischemic recovery of cardiac pump function in exercised trained diabetic rats. *J Appl Physiol* 65: 187-193, 1988.
151. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr. and Sonenberg N. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371: 762-767, 1994.
152. Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J and Dedhar S. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 97: 3207-3212, 2000.
153. Persad S, Attwell S, Mawji N, Deng JT, Yan J, Sanghera J, Walsh MP, Dedhar S and . Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin linked kinase (ILK): Critical roles for kinase activity and amino acids arginine-211 and serine-343. *J Biol Chem* 2001.

154. Price TB, Laurent D, Petersen KF, Rothman DL and Shulman GI. Glycogen loading alters muscle glycogen resynthesis after exercise. *J Appl Physiol* 88: 698-704, 2000.
155. Price TB, Rothman DL, Taylor R, Avison MJ, Shulman GI and Shulman RG. Human muscle glycogen resynthesis after exercise: insulin-dependent and -independent phases. *J Appl Physiol* 76: 104-111, 1994.
156. Pshennikova MG, Prodius PA, Sazontova TG, Golantsova NE and Malyshev II. The role of HSP 70 and Ca(2+)-pump from the myocardial sarcoplasmic reticulum in cardioprotective effects during adaptation to physical load in rats. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova* 84: 1214-1222, 1998.
157. Ramachandran C, Angelos KL and Walsh DA. Cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent antagonism of insulin activation of cardiac glycogen synthase. *J Biol Chem* 257: 1448-1457, 1982.
158. Randle PJ, Garland PB, Newsholme EA and Hales CN. The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 131: 324-333, 1965.
159. Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS and Chen YD. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37: 1020-1024, 1988.

160. Ren J and Bode AM. Altered cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes from spontaneously diabetic BB rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H238-H244, 2000.
161. Ren J and Davidoff AJ. Diabetes rapidly induces contractile dysfunctions in isolated ventricular myocytes. *Am J Physiol* 272: H148-H158, 1997.
162. Richter EA, Derave W and Wojtaszewski JFP. Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol* 535: 313-322, 2001.
163. Rogers MA, Yamamoto C, King DS, Hagberg JM, Ehsani AA and Holloszy JO. Improvement in glucose tolerance after 1 wk of exercise in patients with mild NIDDM. *Diabetes Care* 11: 613-618, 1988.
164. Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A and White MF. Insulin/IGF-1 and TNF-alpha stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest* 107: 181-189, 2001.
165. Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, Galuska D, Bauman DE, Barbano DM, Charron MJ, Zierath JR and Houseknecht KL. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes* 50: 1149-1157, 2001.

166. Sabbah HN. Apoptotic cell death failure. *Cardiovascular research* 45: 704-712, 2000.
167. Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM and Venkatachalam MA. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 17: 3401-3415, 1998.
168. Scheubel RJ, Bartling B, Simm A, Silber RE, Drogaris K, Darmer D and Holtz J. Apoptotic pathway activation from mitochondria and death receptors without caspase-3 cleavage in failing human myocardium*1: Fragile balance of myocyte survival? *Journal of the American College of Cardiology* 39: 481-488, 2002.
169. Schubert KM, Scheid MP and Duronio V. Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol Chem* 275: 13330-13335, 2000.
170. Seals DR, Hagberg JM, Allen WK, Hurley BF, Dalsky GP, Ehsani AA and Holloszy JO. Glucose tolerance in young and older athletes and sedentary men. *J Appl Physiol* 56: 1521-1525, 1984.
171. Shima K, Zhu M, Noma Y, Mizuno A, Murakami T, Sano T and Kuwajima M. Exercise training in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous non-insulin-dependent diabetes mellitus: effects on the B- cell mass,

- insulin content and fibrosis in the pancreas. *Diabetes Res Clin Pract* 35: 11-19, 1997.
172. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Matsuda H and Tsujimoto Y. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* 12: 2251-2257, 1996.
173. Shimoni Y, Ewart HS and Severson D. Type I and II models of diabetes produce different modifications of K⁺ currents in rat heart: role of insulin. *J. Physiol.* 502: 485-496, 1998.
174. Shiraishi J, Tatsumi T, Keira N, Akashi K, Mano A, Yamanaka S, Matoba S, Asayama J, Yaoi T, Fushiki S, Fliss H and Nakagawa M. Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* H1637-H1647, 2001.
175. Sliker LJ, Sundell KL, Heath WF, Osborne HE, Bue J, Manetta J and Sportsman JR. Glucose transporter levels in tissues of spontaneously diabetic Zucker fa/fa rat (ZDF/drt) and viable yellow mouse (Avy/a). *Diabetes* 41: 187-193, 1992.
176. Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, James DE and Lienhard GE. Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7815-7819, 1991.

177. Soltys CL, Buchholz L, Gandhi M, Clanachan AS, Walsh K and Dyck JR. Phosphorylation of cardiac protein kinase B is regulated by palmitate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1056-H1064, 2002.
178. Somerville TC, Linch DC and Khwaja A. Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase- 3 and Bax. *Blood* 98: 1374-1381, 2001.
179. Sonenberg N and Gingras AC. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 10: 268-275, 1998.
180. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5034-5037, 1987.
181. Staal SP, Hartley JW and Rowe WP. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3065-3067, 1977.
182. Stanley, W. C., Lopaschuk, G. D., and McCormack, J. G. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovascular research* 34: 25-33, 1997.

183. Suhara T, Mano t, Oliveira BE and Walsh K. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE- inhibitory protein (FLIP). *Circ Res* 89: 13-19, 2001.
184. Summers SA, Kao AW, Kohn AD, Backus GS, Roth RA, Pessin JE and Birnbaum MJ. The role of glycogen synthase kinase 3B in insulin-stimulated glucose metabolism. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 25: 17934-17940, 1999.
185. Susin SA, Zamzami N and Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366: 151-165, 1998.
186. Suzuki K, Sawa Y, Kagisaki K, Taketani S, Ichikawa H, Kaneda Y and Matsuda H. Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70. *Basic Res Cardiol* 95: 397-403, 2001.
187. Swislocki A and Tsuzuki A. Insulin resistance and hypertension: glucose intolerance, hyperinsulinemia, and elevated free fatty acids in the lean spontaneously hypertensive rat. *Am J Med Sci* 306: 282-286, 1993.

188. Swislocki AL, Hoffman BB and Reaven GM. Insulin resistance, glucose intolerance and hyperinsulinemia in patients with hypertension. *Am J Hypertens* 2: 419-423, 1989.
189. Takahashi T, Taniguchi T, Konishi H, Kikkawa U, Ishikawa Y and Yokoyama M. Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 276: H1927-H1934, 1999.
190. Taniyama Y and Walsh K. Elevated myocardial Akt signaling ameliorates doxorubicin-induced congestive heart failure and promotes heart growth. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1241-1247, 2002.
191. Thorell A, Hirshman MF, Nygren J, Jorfeldt L, Wojtaszewski JFP, Dufresne SD, Horton ES, Ljungqvist O and Goodyear LJ. Exercise and insulin cause GLUT-4 translocation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 277: E733-E741, 1999.
192. Tipton CM. Exercise, training and hypertension: An update. *Exerc Sport Sci Rev* 19: 447-505, 1991.
193. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C and Murphy E. Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3 {beta} During Preconditioning Through a Phosphatidylinositol-3-Kinase-Dependent Pathway Is Cardioprotective. *Circ Res* 90: 377-379, 2002.

194. Tremblay F, Lavigne C, Jacques H and Marette A. Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats. *Diabetes* 52: 29-37, 2003.
195. Tremblay F, Lavigne C, Jacques H and Marette A. Defective Insulin-Induced GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle of High Fat-Fed Rats Is Associated With Alterations in Both Akt/Protein Kinase B and Atypical Protein Kinase C (ζ/λ) Activities. *Diabetes* 50: 1901-1910, 2001.
196. Troussard AA, Tan C, Yoganathan TN and Dedhar S. Cell-Extracellular Matrix Interactions Stimulate the AP-1 Transcription Factor in an Integrin-Linked Kinase- and Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Manner. *Mol Cell Biol* 19: 7420-7427, 1999.
197. Ueki K, Fruman DA, Brachmann SM, Tseng YH, Cantley LC and Kahn CR. Molecular Balance between the Regulatory and Catalytic Subunits of Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Cell Signaling and Survival. *Mol Cell Biol* 22: 965-977, 2002.
198. Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Klein J, Asano T, Cantley LC and Kahn CR. Positive and Negative Roles of p85 α and p85 β Regulatory Subunits of Phosphoinositide 3-Kinase in Insulin Signaling. *J Biol Chem* 278: 48453-48466, 2003.

199. Uphues I, Kolter T, Goud B and Eckel J. Failure of insulin-regulated recruitment of the glucose transporter GLUT4 in cardiac muscle of obese Zucker rats is associated with alterations of small-molecular-mass GTP-binding proteins. *Biochem J* 311 (Pt 1): 161-166, 1995.
200. Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R and Greenberg AH. BNIP3 and Genetic Control of Necrosis-Like Cell Death through the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell Biol* 20: 5454-5468, 2000.
201. Vander Heiden MG, Plas DR, Rathmell JC, Fox CJ, Harris MH and Thompson CB. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. *Mol Cell Biol* 21: 5899-5912, 2001.
202. Veinot JP, Gattinger DA and Fliss H. Early apoptosis in human myocardial infarcts. *Hum Pathol* 28: 485-492, 1997.
203. Virkamaki A, Ueki K and Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103: 931-943, 1999.
204. Wall SR and Lopaschuk GD. Glucose oxidation rates in fatty acid-perfused isolated working hearts from diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 1006: 97-103, 1989.

205. Wang PH, Almahfouz A, Giorgino F, McCowen KC and Smith RJ. In vivo insulin signaling in the myocardium of streptozotocin-diabetic rats: opposite effects of diabetes on insulin stimulation of glycogen synthase and c-Fos. *Endocrinology* 140: 1141-1150, 1999.
206. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR and Klip A. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol* 19: 4008-4018, 1999.
207. Wieland O, Siess E, Schulze-Wethmar FH, von Funcke HG and Winton B. Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat heart and kidney: effect of diabetes, fasting, and refeeding on pyruvate dehydrogenase interconversion. *Arch Biochem Biophys* 143: 593-601, 1971.
208. Williams GT and Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74: 777-779, 1993.
209. Wojtaszewski JF, Higaki Y, Hirshman MF, Michael MD, Dufresne SD, Kahn CR and Goodyear LJ. Exercise modulates postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. *J Clin Invest* 104: 1257-1264, 1999.
210. Wojtaszewski, J. F. P., Higaki, Y., Hirshman, M. F., Dodson Michael, M., Dufresne, S. D., Kahn, C. R., and Goodyear, L. J. Exercise modulates

postreceptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. *J. Clin. Invest.* 104: 1257-1264, 1999.

211. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, Katarinen M, Poulter N, Primatesta P, Rodriguez-Artalejo F, Stegmayr B, Thamm M, Tuomilehto J, Vanuzzo D and Vescio F. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* 289: 2363-2369, 2003.
212. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG and Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell. Biol.* 139: 1281-1292, 1997
213. Woodgett JR. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO* 9: 2431-2438, 1990.
214. Yao R and Cooper GM. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006, 1995.
215. Yen TT, Yu PL, Roeder H and Willard PW. A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously hypertensive rats. *Heredity* 33: 309-316, 1974.

216. Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW and Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277: 50230-50236, 2002.
217. Zhu XX, Zhou XP, Zhong XL, Zhong CS and Yu YF. Streptozotocin induced cardiomyopathy in diabetic rats. *Chin Med J (Engl)* 106: 463-466, 1993.

Annexes

Résumés publiés et présentés à des conférences

Annexe 1

Titre

Possible link with apoptosis in the myocardium of Zucker diabetic fatty (ZDF) rats.

Auteurs

C. Lajoie¹, F. Trudeau², G. Massicotte², S. Gagnon², A. Calderone³ and L. Béliveau¹.

¹Dépt. kinésiologie, Université de Montréal ; ²Gr. de recherche en neurosciences, U. du Québec à Trois-Rivières ; ³Institut de cardiologie de Montréal.

Conférence

Société Canadienne de Physiologie de l'Exercice. Montréal, Québec.

Journal

Canadian Journal of Applied Physiology, 26 (5): 493, 2001.

Résumé

This study examined whether diabetes predisposed the myocardium to apoptosis. We investigated several important molecules potentially linking diabetes and apoptosis, including pro-apoptotic factor Bax, and the anti-apoptotic proteins Bcl2, ERK and PKB, in the ZDF rat model. Compared to lean controls (C) ZDF rats had elevated plasma insulin levels (500 vs 216 pmol), hyperglycaemia (39,2 vs 9,0 mmol), and significantly reduced left ventricular (LV)/body weight (BW) ratio (2,32 vs 2,52). Bax expression was enhanced in ZDF rats (65 % increase), whereas Bcl-2 was unchanged, as compared to C. The level of ERK phosphorylation was significantly greater in the ZDF rats, as compared

to C. Likewise, threonine-phosphorylation of PKB was enhanced in the ZDF rats (243 %increase), whereas the level of serine-phosphorylation was decreased (63 % decrease), as compared to C. The increased expression of Bax, and the decreased serine phosphorylation of PKB support that the myocardium of ZDF rats may be more prone to apoptosis. The subsequent effect of these changes on myocardial function and remodelling remain to be explored.

Annexe 2

Titre

Exercise enhanced HSP72 expression and reversed protein kinase B dephosphorylation in the myocardium of Zucker diabetic fatty (ZDF) rats.

Auteurs

C. Lajoie¹, F. Trudeau², G. Massicotte², S. Gagnon², A. Calderone³ and L. Béliveau¹.

¹Dépt. kinésiologie, Université de Montréal ; ²Gr. de recherche en neurosciences, U. du Québec à Trois-Rivières ; ³Institut de cardiologie de Montréal.

Conférence

Société Canadienne de Physiologie de l'Exercice. St-John, Terre-Neuve.

Journal

Canadian Journal of Applied Physiology, 27 (Suppl.): 29, 2002.

Résumé

Cardiac insulin resistance is a hallmark feature of type 2 diabetes, albeit the underlying mechanisms remain poorly understood. This study tested the hypothesis that dysregulation of PKB, an anti-apoptotic enzyme involved in glucose metabolism may contribute to the defect in the insulin signalling pathway in ZDF rats. A parallel study tested the hypothesis that exercise (10-weeks swimming; 90 min/day) can improve this pathway. The insulin/glucose profile was similar between sedentary (SED; n=5), and exercised (EXE, n=7) wild type (WT) rats. By contrast, plasma insulin levels were increased by $74\pm 18\%$, and glucose levels reduced by $8\pm 2\%$ in EXE ZDF vs SED ZDF. In cardiac lysates from SED ZDF rats, PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation and PKB Thr³⁰⁸ phosphorylation were significantly reduced by $73\pm 3\%$ and $67\pm 2\%$ respectively.

Swimming did not alter PKB Ser⁴⁷³ phosphorylation in WT rats, whereas PKB Thr³⁰⁸ phosphorylation was reduced (41±3%). EXE partially restored PKB Ser⁴⁷³ 39±7% and PKB Thr³⁰⁸ 97±5% phosphorylation in ZDF rats. Additionally, heat shock protein (HSP72) was enhanced by 82% in WT exe and by 101% in ZDF EXE as compared to their respective controls. Collectively, these results suggest a beneficial role of exercise in improving the insulin-link pathway and cyto-protective mechanisms in the heart with type II diabetes.

Annexe 3

Titre

Exercise enhanced PKB phosphorylation and HSP72 expression in the myocardium of spontaneously hypertensive rats (SHR).

Auteurs

C. Lajoie^{1,2}, A. Calderone^{2,3,4} and L. Béliveau^{1,2}. ¹Dept. of kinesiology, ²GRSNA, Université de Montréal; ³Dept. of physiology ⁴Institut de Cardiologie, Montréal.

Conférence

Société Canadienne de Physiologie de l'Exercice. St-John, Terre Neuve.

Journal

Canadian Journal of Applied Physiology, 27 (Suppl.) :29-30, 2002.

Résumé

Diminished PKB activity may in part explain the increased incidence of apoptosis and abnormal glucose metabolism in the myocardium of various cardiac disease states. This study examined whether exercise could improve cardiac PKB phosphorylation in the SHR model. SHRs were trained 5 days/wk on a treadmill for 8 weeks, beginning at 4 weeks of age. Training speed and duration were progressively increased until a final setting of 18 m/min for 120 min/day. In cardiac lysates from the left ventricles of exercised SHR (8), PKB phosphorylation of both Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸ residues was significantly increased (166 and 120% respectively) as compared to sedentary SHR (6). In addition, exercise increased the cardiac protective heat shock protein (HSP72) by 73 % as compared to sedentary SHR. Collectively, these data demonstrate that an exercise

regimen in the SHR ameliorated PKB phosphorylation and HSP72 protein expression, which may improve cardiac energetics and attenuate adverse ventricular remodelling.

