

Université de Montréal

**Les effets cardioprotecteurs de peptides dérivés des  
sécrétagogues de l'hormone de croissance dans le modèle  
d'ischémie-reperfusion du myocarde murin**

par

David Nghi-Nhien Huynh

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

Août, 2018

© David Nghi-Nhien Huynh, 2018

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Les effets cardioprotecteurs de peptides dérivés des sécrétagogues de l'hormone de croissance  
dans le modèle d'ischémie-reperfusion du myocarde murin

Présentée par :  
David Nghi-Nhien Huynh

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Denis deBlois, président-rapporteur  
Sylvie Marleau, directeur de recherche  
Huy Ong, co-directeur  
Guy Rousseau, membre du jury  
David St-Pierre, examinateur externe

## Résumé

Les peptides sécrétagogues de l'hormone de croissance (GHRP) sont des peptides synthétiques qui stimulent la sécrétion de l'hormone de croissance (HC) après la liaison avec le récepteur de la ghréline (antérieurement appelé le récepteur 1a des sécrétagogues de l'hormone de croissance, GHS-R1a). La ghréline désacylée (UAG) est la forme prédominante de la ghréline en circulation, mais l'UAG ne lie pas le récepteur de la ghréline et ne stimule pas la sécrétion d'hormone de croissance. Des études ont montré que les GHRPs et l'UAG possèdent des effets cardioprotecteurs indépendants de la sécrétion de l'hormone de croissance. L'équipe de Ong a identifié le récepteur CD36, exprimé entre autres par les cardiomyocytes, les macrophages et les adipocytes, comme étant un deuxième site de liaison pour les GHRPs, tandis que le récepteur de l'UAG reste encore inconnu à ce jour. L'objectif général de cette thèse était d'évaluer les effets cardioprotecteurs d'une nouvelle classe d'analogues des GHRPs, les azapeptides, qui présentent une plus grande sélectivité envers le récepteur CD36 par comparaison à celui de la ghréline, et les effets cardioprotecteurs d'un fragment peptidique bioactif de l'UAG, l'UAG<sub>6-13</sub>, dans la pathologie de la maladie cardiaque ischémique.

Le modèle d'ischémie/reperfusion du myocarde (I/RM) a été produit par une ligature chirurgicale de l'artère coronaire antérieure descendante gauche pendant 30 min pour induire une ischémie, suivie d'une reperfusion de 6 ou 48 h chez des souris mâles C57BL/6. Les souris ont été prétraitées dans la première étude avec l'azapeptide CP-3(iv) (289 nmol/kg) ou le véhicule (NaCl 0,9%) de manière quotidienne par voie sous-cutanée (s.c.), et dans la deuxième étude avec l'UAG (100 nmol/kg), l'UAG<sub>6-13</sub> (1000 et 3000 nmol/kg) ou le véhicule de manière biquotidienne par voie s.c. avant d'être soumises à une I/RM.

Notre première étude a montré que le CP-3(iv) protège contre les dommages liés à l'I/RM par une réduction de la taille de l'infarctus et une préservation de l'hémodynamique cardiaque. Ces effets résultent en partie d'une augmentation du gène de l'adiponectine et des protéines impliquées dans sa transcription au niveau du tissu adipeux, conduisant à une augmentation des taux circulants de l'adiponectine et une réduction des concentrations plasmatiques des acides gras non estérifiés. Au niveau du myocarde, les propriétés anti-

oxydatives, anti-apoptotiques et pro-métaboliques de l'adiponectine ont été observées. Aucun de ces effets n'a été observé chez les souris déficientes en CD36 et la récupération de la fonction cardiaque par le CP-3(iv) a été abrogée par un anticorps anti-adiponectine dans le modèle de cœur isolé, démontrant la dépendance du récepteur CD36 et l'importance du rôle de l'adiponectine pour médier les effets cardioprotecteurs du CP-3(iv). Notre deuxième étude a montré que l'UAG et l'UAG<sub>6-13</sub> ont réduit le pourcentage de lésions myocardiques et préservé l'hémodynamique cardiaque. Ces effets résultent en grande partie par une diminution des concentrations plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$ . De plus, nos résultats ont montré une diminution de l'apoptose et une activation de la voie AMPK impliquée dans l'oxydation des acides gras au niveau du cœur. Les effets de l'UAG<sub>6-13</sub> sont indépendants du récepteur de la ghréline comme démontré par l'ajout concomitant de la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, un antagoniste du récepteur de la ghréline, dans le modèle de cœur isolé.

En conclusion, les travaux de cette thèse ont montré que les peptides CP-3(iv) et UAG<sub>6-13</sub> possèdent des effets cardioprotecteurs puissants dans la pathologie de l'I/RM et constituent de nouvelles approches thérapeutiques pouvant être appliquées dans les maladies cardiovasculaires ischémiques.

**Mots-clés :** Sécrétagogues de l'hormone de croissance, CD36, ghréline désacylée, ischémie/reperfusion du myocarde, adiponectine, récepteur de la ghréline

## Abstract

Growth hormone-releasing peptides (GHRP) are synthetic peptides that stimulate growth hormone (GH) secretion after binding with the ghrelin receptor (previously known as the growth hormone secretagogue receptor 1a, GHS-R1a). Unacylated ghrelin (UAG) represents the predominant form of ghrelin in circulation, but UAG does not bind to the ghrelin receptor and does not stimulate GH release. Studies have shown that GHRPs and UAG possess cardioprotective effects independent from GH secretion. The group of Ong has identified the CD36 receptor, expressed in cardiomyocytes, macrophages and adipocytes among other cells, as the second binding site for GHRPs, whereas the receptor for UAG is still unknown until this day. The general aim of this thesis was to evaluate the cardioprotective effects of a new class of GHRPs analogues, the azapeptides, which show a higher selectivity towards the CD36 receptor in comparison to that of ghrelin, and the cardioprotective effects of a bioactive peptide fragment of UAG, UAG<sub>6-13</sub>, in the pathology of ischemic heart disease.

The model of myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) was generated by a surgical ligation of the left anterior descending coronary artery for 30 min to induce an ischemia, followed by a reperfusion of 6 or 48 h in C57BL/6 male mice. The mice have been pretreated in the first study with azapeptide CP-3(iv) (289 nmol/kg) or the vehicle (0.9% NaCl) daily by subcutaneous (s.c.) injection, and in the second study with UAG (100 nmol/kg), UAG<sub>6-13</sub> (1000 nmol/kg and 3000 nmol/kg) or the vehicle twice daily by s.c. injection prior to being subjected to MI/R.

Our first study have shown that CP-3(iv) protects against I/RM induced injury by reducing the infarct size and preserving myocardial hemodynamics. These effects result, in part, by an increase in adiponectin production/secretion and proteins involved in its transcription in adipose tissue. This leads to an increase in circulating levels of adiponectin and a decrease in plasma concentration of non-esterified fatty acids. In the myocardium, the anti-oxidative, anti-apoptotic and pro-metabolic properties of adiponectin has been observed. None of these effects was observed in CD36 deficient mice and the function recovery of the heart by CP-3(iv) has been abrogated by an anti-adiponectin antibody in an isolated heart model, showing the dependency for the CD36 receptor and the importance of the role of adiponectin to mediate the

cardioprotective effects of CP-3(iv). Our second study showed that UAG and UAG<sub>6-13</sub> have reduced the percentage of myocardial lesions and preserved cardiac hemodynamics. These effects result largely by a reduction in plasma concentration of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ . Moreover, our results have shown a reduction in apoptosis and an activation of the AMPK pathway involved in fatty acids oxidation in the heart. The effects of UAG<sub>6-13</sub> are independent of the ghrelin receptor as shown by a concomitant addition of D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, a ghrelin receptor antagonist, in the model of isolated heart.

In conclusion, the work conducted in this thesis have shown that CP-3(iv) and UAG<sub>6-13</sub> possess potent cardioprotective effects in the pathology of MI/R and constitute new therapeutic approaches which can be applied in ischemic cardiovascular disease.

**Keywords** : Growth hormone secretagogues, CD36, unacylated ghrelin, myocardial ischemia/reperfusion, adiponectin, ghrelin receptor

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures .....	xi
Liste des abréviations .....	xiii
Remerciements.....	xxvii
Chapitre 1 : INTRODUCTION .....	1
1. Historique de la découverte des sécrétagogues de l’hormone de croissance.....	2
1.1 Le récepteur CD36 .....	6
1.1.1 Historique de la découverte du récepteur CD36.....	6
1.1.2 Expression protéique.....	7
1.1.3 Structure génique .....	10
1.1.4 Internalisation du CD36 .....	14
1.1.5 Rôles physiologiques .....	15
1.1.5.1 Absorption des acides gras à longues chaînes par l’intestin.....	15
1.1.5.2 Transport des acides gras .....	17
1.1.5.3 Le tissu adipeux .....	22
1.1.5.3.1 Emmagasiner des acides gras sous forme de triglycérides.....	22
1.1.5.3.2 La relâche des acides gras par la lipolyse .....	24
1.1.5.3.3 La production des adipokines .....	24
1.1.5.4 Rôle éboueur du CD36 exprimé sur les macrophages .....	25
1.1.5.4.1 LDLox et phospholipides oxydés.....	25
1.1.5.4.2 La phosphatidylsérine oxydée.....	28
1.1.5.5 Rôle du CD36 sur les plaquettes.....	28
1.1.6 Déficience humaine en CD36.....	29
1.1.7 Rôles pathologiques .....	29
1.1.7.1 L’obésité et le diabète .....	30
1.1.7.2 L’athérosclérose.....	32

1.2 Le cœur .....	39
1.2.1 Métabolisme physiologique d'un cœur sain.....	39
1.2.1.1 Les acides gras .....	43
1.2.1.2 Le glucose.....	47
1.2.1.3 Le cycle de Randle .....	48
1.2.1.4 Le cycle de Krebs.....	51
1.2.1.5 La phosphorylation oxydative .....	53
1.2.2 Contraction cardiomyusculaire.....	55
1.2.3 Ischémie/reperfusion du myocarde.....	57
1.2.3.1 Ischémie du myocarde.....	58
1.2.3.1.1 Métabolisme d'un cœur en ischémie.....	58
1.2.3.1.2 Les perturbations ioniques .....	61
1.2.3.1.3 Le stress oxydatif .....	62
1.2.3.1.4 La mort cellulaire .....	63
1.2.3.1.5 L'activité nerveuse sympathique.....	68
1.2.3.2 La reperfusion d'un cœur en ischémie .....	69
1.2.3.2.1 Métabolisme cardiaque à la reperfusion.....	69
1.2.3.2.2 Perturbations ioniques et dysfonction cardiaque .....	72
1.2.3.2.3 Le stress oxydatif .....	74
1.2.3.2.4 L'inflammation .....	76
1.2.3.2.5 La cicatrisation tissulaire .....	80
1.2.3.3 Le conditionnement ischémique .....	82
1.2.3.4 Autres cibles dans la pathologie de l'ischémie/reperfusion du myocarde .....	85
1.2.3.4.1 Akt.....	85
1.2.3.4.2 AMPK.....	87
1.2.3.4.3 Adiponectine .....	89
1.3 La ghréline et sa forme désacylée .....	92
1.3.1 Expression du gène de la ghréline .....	92
1.3.2 Structure de la ghréline .....	95
1.3.3 Expression protéique de la ghréline.....	95
1.3.4 Régulation de la sécrétion de la ghréline .....	97

1.3.5 Récepteur de la ghréline.....	98
1.3.5.1 Le récepteur de la ghréline .....	99
1.3.5.2 Expression du récepteur de la ghréline .....	101
1.3.5.3 Voies de signalisation du récepteur de la ghréline.....	102
1.3.5.4 <i>Ghrelin receptor-like receptors</i> .....	105
1.3.6 Rôles physiologiques, métaboliques et pathophysiologiques de la ghréline et de l'UAG liés au système cardiovasculaire.....	106
1.3.6.1 La prise de poids .....	106
1.3.6.2 Effets de la ghréline et de l'UAG sur le métabolisme .....	107
1.3.6.5.1 Le glucose .....	107
1.3.6.5.2 Les lipides .....	108
1.3.6.3 Effet anti-apoptotique de la ghréline.....	109
1.3.6.4 Effet anti-inflammatoire de la ghréline .....	110
1.3.6.5 Effet de la ghréline sur le stress oxydatif .....	110
1.3.7 Rôles de l'UAG dans la pathologie de l'ischémie/reperfusion du myocarde .....	112
1.4 Les peptides synthétiques dérivés des GHS.....	112
1.4.1 Hexaréline .....	112
1.4.2 EP 80317 .....	115
1.4.3 L'azapeptide CP-3(iv).....	116
1.4.4 Les ligands dérivés de la désacyl-ghréline.....	118
Chapitre 2 : HYPOTHÈSES, OBJECTIFS DE RECHERCHE ET MÉTHODOLOGIE ...	122
2.1 Hypothèses et objectifs de recherche.....	123
2.2 La méthodologie.....	125
2.2.1 Le modèle animal .....	125
2.2.2 La technique d'I/RM.....	126
2.2.2.1 Ligature de l'artère coronaire antérieure descendante gauche .....	126
2.2.2.2 Cœur isolé en mode Langendorff .....	130
2.2.3 Mesure des paramètres hémodynamiques et de la fonction cardiaque <i>in vivo</i> .....	132
Chapitre 3: RÉSULTATS.....	138
3.1 Première étude: Adiponectin has a pivotal role in the cardioprotective effect of CP-3(iv), a selective CD36 azapeptide ligand, after transient coronary artery occlusion in mice.....	139

3.2 Deuxième étude: A linear fragment of unacylated ghrelin (UAG <sub>6-13</sub> ) protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in mice in a growth hormone secretagogue receptor-independent manner .....	175
Chapitre 4 : DISCUSSION.....	208
4.1 L'ischémie/reperfusion du myocarde chez un modèle murin.....	209
4.2 Effets cardioprotecteurs de l'azapeptide CP-3(iv) dans l'I/RM.....	216
4.3 Effets cardioprotecteurs du fragment 6-13 de la ghréline désacylée dans l'I/RM .....	225
Chapitre 5 : PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	232
5.1 Perspectives.....	233
5.1.1 Nouveaux peptides cardioprotecteurs .....	233
5.1.2 Administration du traitement avec un peptide cardioprotecteur .....	233
5.1.3 Effets des peptides dérivés des sécrétagogues de l'hormone de croissance dans le développement de l'insuffisance cardiaque .....	234
5.2 Conclusion .....	236
Bibliographie .....	237
Annexe : Liste des publications .....	i
Publications à titre de premier auteur.....	i
Publications à titre de co-auteur.....	i

## Liste des tableaux

Tableau I.	Contribution relative des différentes voies métaboliques pour produire de l'ATP dans un cœur sain et un cœur reperfusé après une ischémie .....	41
Tableau II.	Les mimétiques de la ghréline en essais cliniques .....	114
Tableau III.	Ligands endogènes et synthétiques du récepteur de la ghréline et des récepteurs CD36 et de l'UAG. ....	121

## Liste des figures

Figure 1.	Moments-clés de la découverte des sécrétagogues de l'hormone de croissance.....	5
Figure 2.	Gènes impliqués dans le métabolisme et qui sont transcrits par les PPARs .....	9
Figure 3.	Représentation du gène et de la protéine du CD36 sous une forme linéaire.....	11
Figure 4.	Représentation topologique du récepteur CD36.....	14
Figure 5.	Mécanismes d'internalisation des acides gras à chaînes longues.....	19
Figure 6.	Lipogenèse et lipolyse dans l'adipocyte .....	23
Figure 7.	Oxydation des LDLs circulants .....	27
Figure 8.	Structure des PCox liant le CD36 .....	27
Figure 9.	Structure de la phosphatidylsérine .....	28
Figure 10.	Désensibilisation à l'insuline dans les cardiomyocytes chez les individus atteints d'obésité .....	32
Figure 11.	Étapes dans le développement de l'athérosclérose qui mène à un infarctus aigu du myocarde .....	39
Figure 12.	Voies métaboliques du glucose et des acides gras dans un coeur sain .....	42
Figure 13.	Stimulation de la translocation des vésicules de CD36 et de GLUT4 au sarcolemme par l'AMPK et Akt .....	44
Figure 14.	La bêta-oxydation des acides gras .....	46
Figure 15.	Le cycle de Randle .....	50
Figure 16.	Le cycle de Krebs.....	52
Figure 17.	Production des espèces réactives de l'oxygène pendant la phosphorylation oxydative et le système d'anti-oxydants cellulaires.....	55
Figure 18.	Contraction des fibres musculaires cardiaques.....	57
Figure 19.	Voies métaboliques du glucose et des acides gras dans un coeur en ischémie .	60
Figure 20.	Perturbation des ions dans les cardiomyocytes en conditions d'ischémie et de reperfusion.....	62
Figure 21.	Génération des ROS en réponse à l'ischémie du myocarde.....	63
Figure 22.	Voies de signalisation menant à l'apoptose.....	67
Figure 23.	Voies métaboliques du glucose et des acides gras dans un coeur reperfusé après une ischémie .....	71

Figure 24.	Perturbation des ions dans les cardiomyocytes en conditions d'ischémie et de reperfusion.....	73
Figure 25.	Source de production de ROS et système anti-oxydant à la reperfusion .....	75
Figure 26.	Migration leucocytaire au site inflammatoire.....	79
Figure 27.	Polarisation et fonctions des macrophages M1 et M2 .....	82
Figure 28.	Voies de signalisation de RISK et de SAFE dans la cardioprotection.....	85
Figure 29.	Voies de signalisation cardioprotectrices de l'adiponectine .....	91
Figure 30.	Structure du gène de la ghréline chez l'homme et étapes de la synthèse de la ghréline.....	94
Figure 31.	Structure de la ghréline .....	95
Figure 32.	Structure du gène du GHS-R.....	98
Figure 33.	Structure du récepteur de la ghréline .....	100
Figure 34.	Sites clés de l'activation par des agonistes et de l'activation constitutive du récepteur de la ghréline .....	101
Figure 35.	Différentes voies de signalisation activées par la ghréline.....	104
Figure 36.	Résumé des similarités et différences des effets de la ghréline et de l'UAG..	111
Figure 37.	Structure d'un acide aminé et d'un aza-acide aminé .....	116
Figure 38.	Le GHRP-6 et ses analogues .....	118
Figure 39.	Structure de l'UAG <sub>6-13</sub> et de l'AZP-531 .....	120
Figure 40.	L'artère coronaire antérieure descendante gauche.....	127
Figure 41.	Occlusion de l'artère coronaire antérieure descendante gauche.....	128
Figure 42.	Double coloration du myocarde par le bleu d'Evans et le TTC .....	130
Figure 43.	Système de Langendorff.....	132
Figure 44.	Boucle de pression-volume .....	134
Figure 45.	Boucles de pression-volume lors d'un changement de la pré-charge.....	137
Figure 46.	Figure récapitulative de la première étude .....	224

## Liste des abréviations

4E-BP1	<i>eukaryotic initiation factor-4E binding protein-1</i>
15d-PGJ2	15-déoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandine J2
aa	acide aminé
ABCA1	transporteur à cassette liant l'ATP ( <i>ATP binding cassette</i> )-A1
ACBP	acyl-CoA binding protein
ACC	acetyl-CoA carboxylase
ACL	<i>ATP citrate lyase</i>
ACS	acyl-CoA synthétase
Adipoq	gène de l'adiponectine
AdipoR1	<i>adiponectin receptor 1</i>
AdipoR2	<i>adiponectin receptor 2</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AG	atrium gauche
AGCL	acide gras à chaîne longue
AGE	produits terminaux de glycation avancée, <i>advanced glycation end products</i>
AGNE	acide gras non estérifié
AGPAT	1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase
AIF	<i>apoptosis inducible factor</i>
Akt	protéine kinase B
Ala	alanine
AMP	adénosine monophosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
ANT	adénine nucléotide translocase
Apaf1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
Apo	apolipoprotéine
APPL1	<i>adaptor protein phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1</i>

ARE	<i>antioxydant-responsive element</i>
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
AS160	substrat de l'Akt 160 kDa
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
Asn	asparagine
Asp	acide aspartique
ATGL	lipase des triglycérides du tissu adipeux
ATP	adénosine triphosphate
AVC	accident vasculaire cérébral
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter protein</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell leukemia/lymphoma-2</i>
Bcl-xL	<i>B cell leukemia/lymphoma-x, long isoform</i>
BEC	boucle extracellulaire
BH2	dihydrobioptérine
BH3	<i>B cell leukemia/lymphoma-2 homology domain 3</i>
BH4	tétrahydrobioptérine
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>bcl-2 interacting killer</i>
Bim	<i>pro-apoptotic Bcl-2-family protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Ca <sup>2+</sup>	calcium
CaMKII	protéine kinase Ca <sup>2+</sup> /calmoduline-dépendante II
CAMKK	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
CARD	<i>caspase activation and recruitment domains</i>
CAT	<i>carnitine acyl-carnitine translocase</i>
CavL	canaux calcium de type L
CCL2	<i>chemokine C-C motif ligand 2</i>

CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CD	<i>conjugated dienes</i>
CD36	classe de différenciation, <i>cluster of differentiation-36</i>
CE <sub>50</sub>	<i>concentration efficace médiane</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
<i>Cebpb</i>	gène du <i>CCAAT/enhancer binding protein beta</i>
Cer	céramide
c-FLIP	<i>FADD-Like IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme-inhibitory protein</i>
CHO	cellules stables d'ovaires de hamsters chinois, <i>chinese hamster ovary</i>
CI <sub>50</sub>	concentration inhibitrice médiane
cIAP-1 et -2	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
CK	créatinine kinase
cLAP	<i>CARD-like apoptotic proteins</i>
CLESH	<i>CD36, LIMP-2 (liver and steroidogenic organs and is a co-receptor for hepatitis C virus), Emp (epithelial membrane protein) sequence homology</i>
CMLV	cellules musculaires lisses vasculaires
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
CoA	coenzyme A
COX-2	cyclooxygénase-2
CPT	carnitine palmitoyltransférase
CRC	capacité de rétention du calcium
CRE	élément de réponse à C/EBP, <i>C/EBP response element</i>
CTE	chaîne de transport des électrons
cTnI, T ou C	troponine I, T ou C
CYP3A4	cytochrome P450 3A4
Cys	cystéine
CX3CL1	fractalkine ou <i>chemokine (C-X3-C motif) ligand 1</i>
CX3CR1	<i>C-X3-C motif chemokine receptor 1</i>
CXCL1 ou 2	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1 ou 2</i>
DAG	diacylglycérol
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>

DC	débit cardiaque
DD	domaines de mort, <i>death domain</i>
DGAT	diacylglycérol acyltransférase
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
dP/dt	dérivée de pression par rapport au temps
DRD1	récepteur de la dopamine D1
DRD2	récepteur de la dopamine D2
EDPVR	<i>end diastolic pressure volume relationship</i>
EDTA	acide éthylène diamine tétra-acétique
Ees	élastance en fin de systole, <i>end-systolic elastance</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
ESPVR	<i>end systolic pressure volume relationship</i>
ET-1	endothéline-1
FABPc	protéine de liaison des acides gras cytosolique, <i>cytosolic fatty acid-binding protein</i>
FABPpm	protéine de liaison des acides gras à la membrane plasmique, <i>plasma membrane fatty acid-binding protein</i>
FAD	flavine adénine dinucléotide
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FADH2	flavine adénine dinucléotide réduite
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FAT	<i>fatty acid translocase</i>
FATP	protéines de transport des acides gras, <i>fatty acid transporter protein</i>
FC $\gamma$ R	récepteur de Fc $\gamma$
FE	<i>fraction d'éjection</i>
FGF	facteur de croissance des fibroblastes, <i>fibroblast growth factor</i>
G3P	glycérol-3-phosphate
GDP	guanosine diphosphate

GFR	récepteur des facteurs de croissance
GHRH	<i>growth hormone-releasing hormone</i>
GHRL	gène humain de la ghréline
GHRP	<i>growth hormone-releasing peptide</i>
GHS	sécrétagogue de l'HC, <i>growth hormone secretagogue</i>
GHS-R1a	<i>growth hormone secretagogue receptor 1a</i>
GlcNAc	N-acétylglucosamine
Gln	glutamine
Glu	acide glutamique
GluR	récepteur du glucagon
GLUT	transporteur du glucose, <i>glucose transporter type</i>
Gly	glycine
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GOAT	O-acyltransférase de la ghréline, <i>ghrelin O-acyltransferase</i>
GP	glycoprotéine
GPAT	glycérol-3-phosphate acyl transférase
GPR103	récepteur 103 couplé aux protéines G, <i>G protein-coupled receptor 103</i>
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
GRLRs	<i>ghrelin receptor-like receptors</i>
GSH	forme réduite du glutathion
GSH-Px	glutathione peroxydase
GSK-3 $\alpha/\beta$	<i>glycogen synthase kinase 3 alpha/beta</i>
GTP	guanosine triphosphate
GTPase	enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la GTP
H <sup>+</sup>	proton
H <sub>2</sub> O	eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HB-EGF	facteur de croissance épidermique liant l'héparine, <i>heparin binding epidermal growth factor</i>
HC	hormone de croissance

HDL	lipoprotéines de haute densité, <i>high density lipoprotein</i>
HETE	acide hydroxyeicosatétraénoïque
HIF	facteur inductible à l'hypoxie, <i>hypoxia-inducible factors</i>
His	histidine
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HMW	haut poids moléculaire, <i>high molecular weight</i>
HODE	acide hydroxyoctadécaénoïque
HO-1	hème oxydase
HRE	élément de réponse à l'hypoxie, <i>hypoxia response element</i>
HSL	lipase hormono-sensible, <i>hormone sensitive lipase</i>
HSP	<i>heat shock proteins</i>
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>
123I-BMIPP	<i>15-(p-iodophenyl)-3-(R, S)-methyl pentadecanoic acid</i>
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire
123I-IPPA	<i>15-(p-iodophenyl) pentadecanoic acid</i>
i.v.	intraveineux
I/RM	ischémie-reperfusion du myocarde
IAM	infarctus aigu du myocarde
ICAM-1	molécule d'adhérence intercellulaire-1, <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IECA	inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IGFBP-3	<i>insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
IKK	<i>inhibitor of <math>\kappa</math>B kinase</i>
IL	interleukine
IL-1R	récepteur de l'interleukine-1, <i>interleukin-1 receptor</i>
Ile	isoleucine
IFN- $\gamma$	interféron $\gamma$
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
INSR	récepteur à l'insuline
IP3	inositol triphosphate
IP3R	récepteur de l'inositol triphosphate

IRS	substrat du récepteur de l'insuline
ITAM	motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine, <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor <math>\alpha</math></i>
JAK	Janus kinases
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KD	constante de dissociation
kDa	kilodalton
LAD	artère coronaire antérieure descendante gauche
LDH	lactate déshydrogénase
LDL	lipoprotéines de basse densité, <i>low density lipoprotein</i>
LDLox	lipoprotéines de basse densité oxydées, <i>oxidized low-density lipoprotein</i>
Leu	leucine
LFA-1	antigène-1 associé à la fonction des lymphocytes, <i>leukocyte function associated antigen-1</i>
LIMP-2	protéine membranaire intégrale lysosomale, <i>lysosomal integral membrane protein-2</i>
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
LOX	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>
LDL	lipoprotéines de faible densité, <i>low density lipoprotein</i>
LDLR	récepteur des lipoprotéines de faible densité, <i>low density lipoprotein receptor</i>
LPL	lipoprotéine lipase
LTB4	leucotriène B4
Lys	lysine
Mac-1	antigène de macrophage-1, <i>macrophage-1 antigen</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MC3	mélanocortine de type 3
MCD	malonyl-CoA décarboxylase
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>

MDA	malondialdéhyde
MEK	<i>methyl ethyl ketone</i>
MEKK	MEK kinase 1
Mertk	<i>myeloid epithelial reproductive receptor tyrosine kinase</i>
Met	méthionine
MGL	lipase des monoglycérides, <i>monoglyceride lipase</i>
MKK	MAP kinase kinase
MLC	<i>myosin light chain</i>
MLCP	<i>myosin light chain phosphatase</i>
MLKL	<i>mixed kinase domain like protein</i>
MLNR	récepteur de la motiline
MM	minimalement modifié
MMP	métalloprotéinase matricielle
MPC	transporteur de pyruvate mitochondrial, <i>mitochondrial pyruvate carrier</i>
MPO	myéloperoxidase
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NBRE	<i>NGFI-B responsive element</i>
NCX	échangeur Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup>
NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NFκB	facteur nucléaire kappa B, <i>nuclear factor kappa B</i>
NGFI-B	<i>nerve growth factor-induced gene-B</i>
NHE	échangeur Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup>
NLRP3	NOD-like receptor family, <i>pyrin domain containing 3</i>

NMUR	récepteur de la neuromédine U
NO	oxyde nitrique
NO <sub>2</sub>	dioxyde d'azote
NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i>
NOS	synthases d'oxyde nitrique, <i>nitric oxide synthase</i>
NOX	sous-unité de la NADPH-oxydase, ou gp91phox
NPC1L1	<i>Niemann–Pick C1-like 1</i>
NPR	récepteur des peptides natriurétiques
Nrf2	<i>E2-related factor 2</i>
NTSR	récepteur de la neurotensine
O <sub>2</sub>	oxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anion superoxyde
•OH	radicaux hydroxyl
OH <sup>-</sup>	ion hydroxyl
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrite
p70S6K	p70 ribosomal S6 protein kinase
PAF	facteur d'activation plaquettaire, <i>platelet-activating factor</i>
PAFR	récepteur du facteur d'activation plaquettaire
PAMP	motifs moléculaires associés aux pathogènes, <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PAOEC	cellules endothéliales d'aortes de porcs, <i>porcine aortic endothelial cells</i>
PAS-4	<i>periodic acid/Schiff-staining-band-4</i>
PC	phosphatidylcholines
PC1/3	convertase de prohormone 1/3, <i>prohormone convertase 1/3</i>
PCK1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
PDE	phosphodiesterase
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes, <i>platelet derived growth factor</i>
PDH	pyruvate déshydrogénase
PDK	pyruvate déshydrogénase kinase
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase</i>
PDP	pyruvate déshydrogénase phosphatase

PECAM-1	molécule d'adhérence des cellules endothéliales et des plaquettes
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK-1	phosphofructokinase-1
PGC-1 $\alpha$	co-activateur de transcription 1-alpha de PPAR $\gamma$
PGE2	prostaglandine E2
PGI2	prostacycline
Phe	phénylalanine
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PiC	transporteur de phosphate inorganique, <i>inorganic phosphate carrier</i>
PIP2	phosphoinositol 4,5 diphosphate
PIP3	phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase G
PLB	phospholamban
PLC	phospholipase C
PLox	phospholipides oxydés
PP2C $\alpha$	protéine phosphatase 2C $\alpha$
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	élément de réponse aux proliférateurs de peroxyosomes, <i>peroxisome proliferator response element</i>
PRGC	peptide relié au gène calcitonine
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PRSW	relation entre le TS en fonction du VTD, <i>preload recruitable stroke work</i>
PS	phosphatidylsérine
PSGL-1	ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine, <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PTEN	homologue de phosphatase et tensine
PTPm	pore de transition de perméabilité mitochondriale
PTS	pression télésystolique
PV	pression-volume
Q	ubiquinone

QH <sub>2</sub>	ubiquinone réduite
QRFP	récepteur des peptides RF-amide, <i>pyroglutamylated RF-amide peptides</i>
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end-products</i>
Raptor	<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>
RAR	région à risque
RCPG	récepteurs couplés aux protéines G, <i>G-protein-coupled receptor</i>
RE	réticulum endoplasmique
RI	région infarctée
RIC	<i>remote ischemic conditioning</i>
RIP1	<i>receptor interacting protein 1</i>
RISK	<i>reperfusion injury salvage kinase</i>
RNS	espèces réactives de l'azote, <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	espèces réactives de l'oxygène, <i>reactive oxygen species</i>
RPE	épithélium pigmentaire de la rétine
RPP	<i>rate pressure product</i>
RVS	résistance vasculaire systémique
RyR	récepteur de la ryanodine
RXR	récepteur X de rétinoïdes
s.c.	sous-cutanée
S1P	sphingosine-1-phosphate
S6K1	<i>mitogen-stimulated protein kinase p70 ribosomal protein S6 kinase 1</i>
SAFE	<i>survivor activating factor enhancement</i>
SCARB3	<i>scavenger receptor class B member 3</i>
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
Ser	sérine
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, <i>sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sGC	guanylate cyclase soluble
SH2	homologie au SRC 2
Sharpin	<i>SHANK-associated RH domain interacting protein</i>
SHR	rats hypertendus spontanément

SIRT1	sirtuine 1
s-Lex	antigène x de sialyl Lewis
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI</i>
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i>
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i>
SOD	superoxyde dismutase
SR	réticulum sarcoplasmique
SR-A1	récepteurs éboueurs de classe A, <i>scavenger receptor A1</i>
SR-B1	récepteurs éboueurs de classe B, <i>scavenger receptor B1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SSO	sulfo-N-succinimidyl oléate
SSTR5	récepteur de la somatostatine de type 5
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAK1	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TBC1D	<i>Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family member</i>
TEP	tomographie par émission de positron
TG	triglycéride
TGF	facteur de croissance transformant, <i>transforming growth factor</i>
Thr	thréonine
TIMP	inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNF-R1	<i>tumor necrosis factor receptor 1</i>
TNFRSF1A	<i>(TNF receptor superfamily member 1A) associated via death domain</i>
TRADD	<i>TNF receptor superfamily 1A-associated via death domain</i>
TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
TRAIL	<i>tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand</i>

Trp	tryptophane
TS	travail systolique
TSC2	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>
TSP	thrombospondine
TSR	<i>thrombospondin type 1 repeats</i>
TTC	chlorure de triphényltétrazolium
TXA2	thromboxane A2
Tyr	tyrosine
TZD	thiazolidinediones
UAG	ghréline désacylée, <i>unacylated ghrelin</i>
V0	canal de protons V0
V1	ATPase cytosolique V1
Val	valine
VAMP	protéine membranaire associée aux vésicules, <i>vesicle-associated membrane protein</i>
v-ATPase	ATPase vacuolaire
VCAM-1	molécule d'adhérence de cellules vasculaires-1, <i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VE	volume d'éjection
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VG	ventricule gauche
VLA6	<i>very late antigen 6</i>
VLDL	lipoprotéine de très faible densité, <i>very low density lipoprotein</i>
VTD	volume télédiastolique
VTS	volume télésystolique
vWF-C	<i>von Willebrand factor type C</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
$\alpha\beta 1$	intégrine liant la laminine
$\beta 1$	intégrines faisant partie de la famille de $\beta 1$

*Je dédie cette thèse  
à Sylvie Marleau,  
à ma famille,  
et à tous ceux que j'aime*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, Dre Sylvie Marleau. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire pour mon stage de baccalauréat, la maîtrise et le doctorat. Le parcours que nous avons fait ensemble a été très intéressant, stimulant et plein de plaisirs. Votre enthousiasme et votre dévouement pour la recherche et le laboratoire et votre positivité m'ont beaucoup inspiré pour aboutir à la fin de cette thèse. Je vous suis extrêmement reconnaissant pour vos encouragements et pour m'avoir poussé à atteindre mes accomplissements présents. Vous inclure dans les dédicaces de cette thèse est la moindre des choses que je puisse faire pour vous remercier.

Je tiens à remercier mon co-directeur de thèse, Dr Huy Ong, qui a toujours été disponible pour une rencontre et pour partager son expertise scientifique. Je vous remercie de toujours m'avoir poussé à aller plus loin.

Je tiens à remercier Dr Denis deBlois qui a été membre de mon comité consultatif. Vos conseils et vos commentaires étaient très instructifs. J'ai beaucoup apprécié la forme et le contenu de vos questions qui étaient bien ciblés et qui me permettaient d'enrichir mes connaissances.

Je remercie tous les membres de notre laboratoire, incluant ceux du laboratoire de Dr Ong. Je remercie Valérie avec qui j'ai beaucoup travaillé depuis mon stage jusqu'au début de mon doctorat. Ton côté perfectionniste a été très inspirant. Je remercie Liliane avec qui j'ai travaillé du début jusqu'à la fin de mon doctorat. Ta persévérance m'a beaucoup inspiré, nos discussions et les mises au point qu'on a fait ensemble sont mémorables. Je voudrais remercier Petra, Dilan et Christian qui ont été très patients pour répondre à toutes mes dix milles questions et sur qui je peux toujours compter. Merci Katia d'avoir été une très bonne amie et collègue de travail. Merci Hanan pour ta participation dans nos projets. Je remercie Dr Yan Burelle ainsi que tous ses étudiants avec qui on a beaucoup collaboré. Je remercie aussi tous les techniciens en santé animale et les stagiaires qui sont passés dans notre laboratoire (plus d'une quarantaine...) qui ont été impliqués dans nos projets. Un gros merci à Geneviève qui a géré seule le laboratoire pendant une partie de la rédaction de ma thèse.

Je remercie le FRQS et le GRUM pour leur aide financière pendant mon doctorat, ainsi que les organismes subventionnaires FMCQ (HSFQ) et IRSC (CIHR) pour la réalisation d'une étude. Je remercie l'Université de Montréal et la faculté de pharmacie pour m'avoir permis de faire des études graduées dans un environnement si bien encadré. Merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Un très grand merci à mes parents, ma sœur et mes frères qui m'ont supporté tout au long de mes études doctorales. Je remercie Liliane à nouveau avec qui je partage ma vie. Tes encouragements et ton soutien ont été capitaux dans la rédaction de cette thèse. Merci à notre petit Samuel, qui est né pendant la rédaction de la thèse, pour m'avoir motivé à finir cette thèse. Un merci chaleureux à ma belle-famille qui m'a accueilli et qui m'a encouragé pendant mon doctorat.

## **Chapitre 1 : INTRODUCTION**

# 1. Historique de la découverte des sécrétagogues de l'hormone de croissance

En 1975, Morris et son équipe découvrent la Met-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) (Tyr, tyrosine; Gly, glycine; Phe, phénylalanine; Met, méthionine) et la Leu-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) (Leu, leucine), deux peptides endogènes des récepteurs opiacés qui ont une affinité supérieure pour le sous-type delta ( $\delta$ ) que le sous-type mu ( $\mu$ ) (Hughes et coll., 1975). Par la suite, l'équipe de Bowers a entrepris les travaux de synthèse de peptides analogues des enképhalines présentant des activités sécrétrices de neurohormones et a présenté leurs premiers résultats dans une conférence internationale d'endocrinologie en 1977 (Bowers, 2012) (voir Figure 1 pour un résumé des moments-clés à propos de la découverte des sécrétagogues de l'hormone de croissance). Parmi ces composés, l'analogue amidé D-Trp<sup>2</sup>-Met enképhaline (Tyr-D-Trp-Gly-Phe-Met-NH<sub>2</sub>) (Trp, tryptophane) présentait la capacité de stimuler la relâche d'hormone de croissance (HC) par l'hypophyse antérieure de rat *ex vivo*, sans toutefois agir sur les récepteurs opiacés ni causer le relâche de d'autres neurohormones hypophysaires (Bowers, 2012; Bowers et coll., 1980). Dans cette étude, Bowers et coll. ont remarqué que la substitution du deuxième acide aminé (aa) de la Met-enképhaline par un acide aminé aromatique dans une conformation D et l'ajout d'un groupement amide en C-terminal étaient importants pour stimuler la relâche d'HC par des cellules hypophysaires de rats *ex vivo* (Bowers et coll., 1980). Momany et coll. ont apporté des modifications structurales supplémentaires à certains analogues, en se basant sur des calculs d'énergie conformationnelle et des études de structure-activité, parvenant ainsi à augmenter leur activité sécrétoire de l'HC (Momany et coll., 1981; Momany et coll., 1984). L'hexapeptide GHRP-6 (*growth hormone-releasing peptide-6*) fut le premier analogue synthétique des sécrétagogues de l'HC (GHS, *growth hormone secretagogue*) capable d'induire le relâche d'HC par l'hypophyse antérieure de rat dans un modèle *ex vivo*, ainsi qu'*in vivo* (Bowers et coll., 1984; Momany et coll., 1984). Cet hexapeptide a été le premier GHS administré chez l'homme pour induire la sécrétion d'HC en 1988 (Bowers et coll., 1990).

Tandis que l'équipe de Bowers étudiait le mécanisme d'action des GHS synthétiques et de leurs propriétés sécrétagogues du récepteur de l'HC, deux hormones naturelles furent isolées

dans des pancréas tumoraux humains, la GHRH 1-44NH<sub>2</sub> (*growth hormone-releasing hormone* 1-44NH) et la GHRH 1-40-OH (Guillemin et coll., 1982; Rivier et coll., 1982). Les résultats d'études comparant les effets des GHRH 1-44NH<sub>2</sub> et GHRH 1-40-OH avec ceux du GHRP-6 ont montré un synergisme de l'activité sécrétagogue de l'HC du GHRP-6 et de la GHRH. De plus, il a été observé que le GHRP-6 n'induisait pas une augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans les cellules hypophysaires contrairement à la GHRH, de pair avec l'absence de compétition du GHRP-6 pour le récepteur de la GHRH (Bowers, 2012). D'autre part, tandis que l'administration continue de la GHRH causait une sécrétion continue d'HC, elle ne durait pas plus d'une heure pour le GHRP-6 et enfin, la GHRH ne semblait agir qu'au niveau de l'hypophyse, alors que le GHRP-6 pouvait en plus agir au niveau de l'hypothalamus pour induire la sécrétion d'HC (Badger et coll., 1984; Bowers, 2012; Bowers et coll., 1984; Codd et coll., 1989; McCormick et coll., 1985). La substitution de l'aa en 3<sup>ème</sup> position du GHRP-6 par une D-Lysine (Lys) a donné naissance au premier antagoniste du récepteur des GHS, soit la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, inhibant l'effet du GHRP-6 mais pas celui de la GHRH sur la sécrétion d'HC (Bowers et coll., 1991). Ces observations ont suggéré que le GHRP-6 n'était pas un mimétique de la GHRH, suggérant l'existence d'un récepteur propre au GHRP-6 et d'un présumé ligand endogène encore inconnu à cette époque.

C'est ainsi que plusieurs groupes de recherche, au niveau académique et de l'industrie pharmaceutique, se sont lancés dans la course pour identifier le ligand naturel et le récepteur des GHS. C'est en 1996 que le récepteur des GHS a été identifié et cloné à l'aide du ligand non-peptidique ayant une activité sécrétagogue de l'HC, le MK-0677 (Howard et coll., 1996; Patchett et coll., 1995; Smith et coll., 1996). Deux séquences polypeptidiques ont en fait été identifiées: la première correspondait à un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) à 7 passages transmembranaires d'une longueur de 366 aa, nommé GHS-R1a (*growth hormone secretagogue receptor 1a*), maintenant appelé récepteur de la ghréline (Davenport et coll., 2005), tandis que la deuxième était une forme tronquée du récepteur de la ghréline ne présentant que 5 passages transmembranaires d'une longueur de 289 aa, nommée GHS-R1b. La transfection des cellules COS-7 exprimant le récepteur de la ghréline et le GHS-R1b a montré que le MK-0677, le GHRP-6 et le GHRP-2 (un analogue des GHS plus puissant que le GHRP-6 comme sécrétagogue de l'HC) liaient tous avec une grande affinité et de façon sélective le

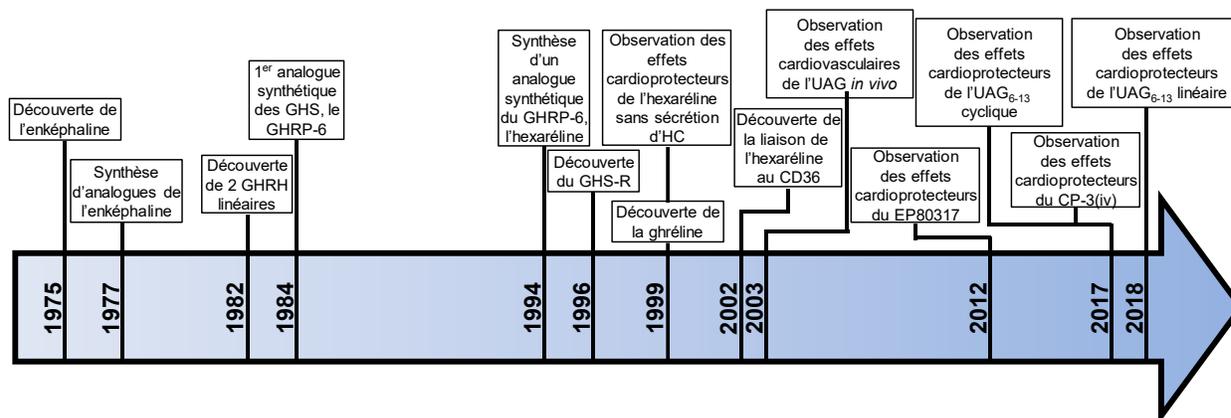
récepteur de la ghréline et que la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 inhibait cette liaison de manière compétitive (Howard et coll., 1996).

En 1999, l'équipe de Kojima et Kangawa a identifié le ligand endogène du récepteur de la ghréline (Kojima et coll., 1999). La construction d'une lignée cellulaire stable d'ovaires de hamsters chinois (CHO, *chinese hamster ovary*) surexprimant le récepteur de la ghréline leur a permis de suivre l'augmentation du calcium (Ca<sup>2+</sup>) intracellulaire par différents extraits d'organes. Étonnamment, l'organe qui présentait la plus haute activité était l'estomac, d'où ils ont purifié et séquencé un peptide de 28 aa. Ce peptide présentait une structure unique, en raison d'un groupement *n*-octanoyl acylé sur la sérine en 3<sup>ème</sup> position. Ils ont confirmé que ce peptide stimulait la sécrétion spécifique d'HC et que la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 présentait un effet antagoniste du peptide envers le récepteur de la ghréline. De plus, la synthèse de ce peptide sans son groupement *n*-octanoyl sur la sérine ne présentait plus d'effet sécrétagogue de l'HC (Kojima et coll., 1999). Ils nommèrent donc ce peptide ghréline en fonction de sa nature à induire la relâche d'HC, selon la racine proto-indo-européenne « *ghre* » qui signifie croissance (*grow*) et « *relin* », qui signifie libération (*release*) par un peptide. La forme désacylée de ce peptide fut nommée désacyl-ghréline, mais est aussi appelée *unacylated ghrelin* (UAG).

De façon parallèle, l'équipe de Berti utilisa l'hexaréline (His-D-2-Méthyl-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) (His, histidine; Ala, alanine), un analogue synthétique du GHRP-6, développé par l'équipe de Deghenghi (Deghenghi et coll., 1994), pour traiter l'hypopituitarisme. Des études subséquentes ont permis d'observer que chez des rats traités avec un sérum anti-GHRH, le traitement avec l'hexaréline rétablissait la fonction somatotrope et améliorait la fonction cardiaque de cœurs de rats isolés soumis à une ischémie/reperfusion du myocarde (I/RM) (De Gennaro Colonna et coll., 1997a; De Gennaro Colonna et coll., 1997b). En 1999, l'équipe de Berti a remarqué que l'hexaréline présentait des effets cardioprotecteurs dans un modèle d'I/RM de rats soumis à une hypophysectomie (Locatelli et coll., 1999), suggérant la présence d'un autre récepteur que le récepteur de la ghréline médiant les effets cardioprotecteurs du peptide (Bodart et coll., 1999). Ce récepteur putatif fut identifié par l'équipe de Ong en 2002 comme étant le récepteur CD36 (classe de différenciation, *cluster of differentiation-36*) (Bodart et coll., 2002).

Ainsi, dans les membranes de cœurs de rats et de souris, l'hexaréline pouvait lier deux récepteurs, soit le récepteur de la ghréline et le récepteur CD36.

Les études initiales avec l'UAG ont montré que ce peptide ne liait pas le récepteur de la ghréline (Bednarek et coll., 2000) et ne semblait pas présenter d'activité endocrine (Kojima et coll., 1999), contrairement à la ghréline. Toutefois, des propriétés anti-apoptotiques de la ghréline mais aussi de l'UAG sur les cardiomyocytes H9c2, qui n'expriment pas le récepteur de la ghréline, ont été observées, suggérant qu'un autre site de liaison commun à ces deux formes de ghréline existait entre autres au niveau du système cardiovasculaire (Baldanzi et coll., 2002). Par la suite, une étude *ex vivo* a montré que la ghréline et l'UAG diminuent la contraction ventriculaire des cobayes à des doses équimolaires (Bedendi et coll., 2003) et appuyait l'hypothèse selon laquelle l'UAG n'était pas seulement une forme inactive de la ghréline.



**Figure 1. Moments-clés de la découverte des sécrétagogues de l'hormone de croissance** GHRH, hormone de libération de l'hormone de croissance (*growth hormone-releasing hormone*); GHRP, peptide sécrétagogue de l'hormone de croissance (*growth hormone-releasing peptide*); GHS-R, récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance (*growth hormone secretagogue receptor*); HC, hormone de croissance; UAG, ghréline désacylée (*unacylated ghrelin*).

Au constat de ces deux cibles potentielles, le récepteur de la ghréline et le récepteur CD36 dans la cardioprotection, nous avons caractérisé, au cours des dernières années, les effets cardioprotecteurs de petits peptides synthétiques ciblant l'un ou l'autre de ces récepteurs. Afin

de faciliter la compréhension du lecteur, nous discuterons dans la première section de l'introduction, des caractéristiques du récepteur CD36 et de son implication physiologique et pathologique. La deuxième partie traitera sur le métabolisme cardiaque en condition physiologique, pendant un infarctus aigu du myocarde (IAM) et suite à la reperfusion. Les événements qui en découlent seront aussi détaillés, puisque cette thèse porte sur les effets cardioprotecteurs des ligands synthétiques du récepteur CD36 et d'un peptide synthétique de l'UAG dans la pathologie d'I/RM. La troisième partie de l'introduction traitera des ligands des récepteurs de la ghréline, ghréline-*like* et de l'UAG. Et finalement, la quatrième partie portera sur les ligands synthétiques du récepteur CD36 et de l'UAG dans le traitement de l'I/RM.

## **1.1 Le récepteur CD36**

### **1.1.1 Historique de la découverte du récepteur CD36**

Le récepteur CD36 a été identifié pour la première fois en 1977 lors de l'isolation des différentes glycoprotéines à la surface des plaquettes humaines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) et il fut à ce moment nommé glycoprotéine IIIb ou IV (GPIIIb ou GPIV) (Clemetson et coll., 1977). En 1985, l'utilisation de l'anticorps monoclonal OKM5, développé par le groupe de Goldstein (Talle et coll., 1983) dans le but de reconnaître les différentes populations de monocytes, a montré une inhibition de la liaison des monocytes avec des érythrocytes infectés avec le parasite de la malaria, le *Plasmodium falciparum*, et que l'OKM5 reconnaissait une glycoprotéine de 88 kilodaltons (kDa) semblable à la GPIV (Barnwell et coll., 1985). Lors de l'établissement de la nomenclature des antigènes de différenciation des leucocytes humains, la glycoprotéine IV a été rebaptisée CD36 (Shaw, 1987). L'utilisation d'anticorps reconnaissant le CD36 a permis de l'identifier comme étant un récepteur plaquettaire pour la thrombospondine (TSP) (Asch et coll., 1987), un récepteur des macrophages pour les lipoprotéines de faible densité oxydées (LDLox, *oxidized low density lipoprotein*) (Endemann et coll., 1993) et un récepteur des adipocytes pour les acides gras à chaînes longues (AGCL) (Abumrad et coll., 1993), expliquant ainsi son rôle dans l'agrégation plaquettaire, de récepteur éboueur et de facilitateur du transport des acides gras. Comme le

récepteur CD36 possède des fonctions pléiotropes, il n'est pas surprenant qu'on lui ait attribué plusieurs noms, dont FAT (*fatty acid translocase*), SCARB3 (*scavenger receptor class B member 3*), récepteur à la TSP et PAS-4 (*periodic acid/Schiff-staining-band-4*) (Rac et coll., 2007). Puisque le récepteur CD36 présente une homologie avec les membres de la superfamille des récepteurs éboueurs de classe B, qui inclut le récepteur éboueur B1 (SR-B1, *scavenger receptor B1*) et la protéine membranaire intégrale lysosomale (LIMP-2, *lysosomal integral membrane protein-2*) (Neculai et coll., 2013), on lui a attribué le nom officiel de SR-B2 (*scavenger receptor B2*), en 2014 (Prabhudas et coll., 2014).

### 1.1.2 Expression protéique

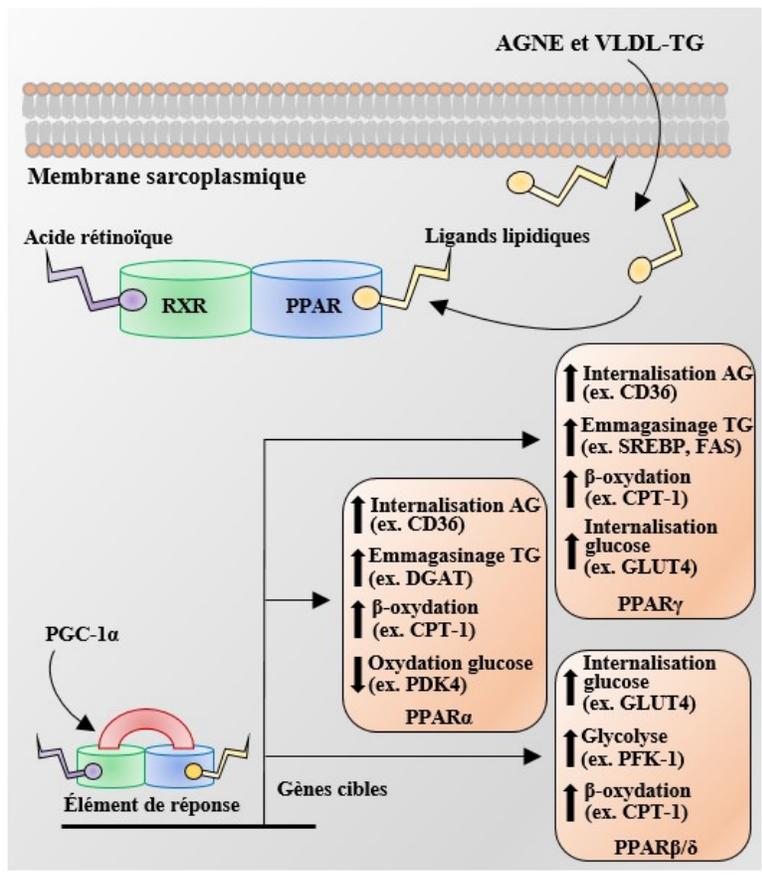
Le récepteur CD36 est exprimé au niveau de plusieurs types cellulaires, incluant les cellules hématopoïétiques, tels que les plaquettes (Asch et coll., 1987; Tandon et coll., 1989; Zhu et coll., 2012), les mégacaryocytes (Febbraio et coll., 2001), les cellules dendritiques (Albert et coll., 1998), les monocytes et les macrophages (Endemann et coll., 1993; Savill et coll., 1992), les cellules endothéliales de la microvasculature (Swerlick et coll., 1992), les cellules épithéliales mammaires (Cleazardin et coll., 1993), rétinienne (Ryeom et coll., 1996) et gustatives (Fukuwatari et coll., 1997), les neurones hypothalamiques (Le Foll et coll., 2009), les cellules sujettes à d'importants influx de lipides, tels que les adipocytes (Harmon et Abumrad, 1993; Qiao et coll., 2008), les entérocytes (Hsieh et coll., 2009; Poirier et coll., 1996), les myocytes squelettiques (Bezaire et coll., 2006) et les cardiomyocytes (Bodart et coll., 2002; Van Nieuwenhoven et coll., 1995) et d'autres cellules comme les hépatocytes (Miquilena-Colina et coll., 2011), les cellules mésangiales (Hughes et coll., 1997) et les podocytes (Hua et coll., 2015). Le CD36 possède donc un large éventail de fonctions dont sa participation dans la détection de lipides au niveau des papilles gustatives (Laugerette et coll., 2005; Martin et coll., 2011; Niot et Besnard, 2017), l'absorption des acides gras par les intestins (Harmon et coll., 1991; Nassir et coll., 2007), l'emmagasinage de lipides dans le tissu adipeux (Allred et coll., 2011), le métabolisme des acides gras dans les muscles cardiaque et squelettique (Holloway et coll., 2008; Su et Abumrad, 2009; Xu et coll., 2013), l'efflux du cholestérol par les macrophages (Avallone et coll., 2006; Bujold et coll., 2013), la liaison et l'internalisation des LDLox (Febbraio et Silverstein, 2007), des produits terminaux de glycation avancée (AGE, *advanced*

*glycation end products*) (Ohgami et coll., 2001) et des bêta-amyloïdes (Moore et coll., 2002). Un rôle pour ce récepteur a été proposé dans différents contextes physiologiques et pathologiques dont la réponse inflammatoire (Silverstein et Febbraio, 2009), l'angiogenèse (Febbraio et coll., 2001), l'adhésion cellulaire (Tandon et coll., 1989), l'infection à la malaria (Cabrera et coll., 2014), l'athérosclérose (Febbraio et Silverstein, 2007), la cardiopathie ischémique (Cho et coll., 2005; Irie et coll., 2003), les désordres métaboliques, tels que l'obésité (Bonen et coll., 2006) et le diabète (Gautam et Banerjee, 2011), la dégénérescence maculaire (Picard et coll., 2010) et la maladie de l'Alzheimer (Coraci et coll., 2002; Sery et coll., 2017).

L'expression du récepteur CD36 est régulée par l'activation d'un récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*) dans plusieurs types cellulaires, excluant les plaquettes qui sont anucléées. Les PPARs sont une famille de récepteurs nucléaires activés par diverses molécules endogènes, tels que les acides gras [surtout les acides gras à chaînes longues (AGCL)] (Grimaldi et coll., 1999) et leurs métabolites [acyl-CoA (coenzyme A), les prostaglandines, les écosanoïdes et les produits de lipoxygénase comprenant l'acide hydroxyoctadécaénoïque (HODE) et l'acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE)] (Georgiadi et Kersten, 2012; Han et coll., 1997), ou exogènes, tels que les fibrates qui activent PPAR $\alpha$  (Fruchart et coll., 1999) et les thiazolidinediones (TZD) qui activent PPAR $\gamma$  (Lehmann et coll., 1995), et régulent la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme, l'inflammation, la prolifération et la différenciation de différents types cellulaires, tels que les adipocytes, les macrophages et les cellules musculaires squelettiques et cardiaques (Figure 2) (Neels et Grimaldi, 2014; Tyagi et coll., 2011).

Les PPARs peuvent former un hétérodimère avec le récepteur X de rétinoïdes (RXR) et lier l'acide désoxyribonucléique (ADN) sur la séquence de l'élément de réponse aux proliférateurs de peroxyosomes (PPRE, *peroxisome proliferator response element*) afin d'initier la transcription des gènes cibles (Avallone et coll., 2006). La séquence de PPRE a été identifiée, entre autres, sur le site de transcription codant pour le gène du CD36 chez la souris (Teboul et coll., 2001) et chez l'homme (Tontonoz et coll., 1998). D'autres activateurs de transcription, tels que CCAAT/*enhancer-binding protein* (C/EBP)- $\alpha$  qui lie le site d'élément de réponse à

C/EBP (CRE, *C/EBP response element*) (Qiao et coll., 2008) et le facteur inductible à l'hypoxie (HIF-1, *hypoxia inducible factor-1*) qui se lie sur le site HRE (*hypoxia response element*), ont été identifiés comme pouvant augmenter l'expression du CD36 dans le tissu adipeux et les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE), respectivement (Chanda et coll., 2016; Mwaikambo et coll., 2009). Le co-activateur de transcription 1-alpha de PPAR $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ) stimule les PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  dans la transcription des gènes cibles (Lopaschuk et coll., 2010).



**Figure 2. Gènes impliqués dans le métabolisme et qui sont transcrits par les PPARs**

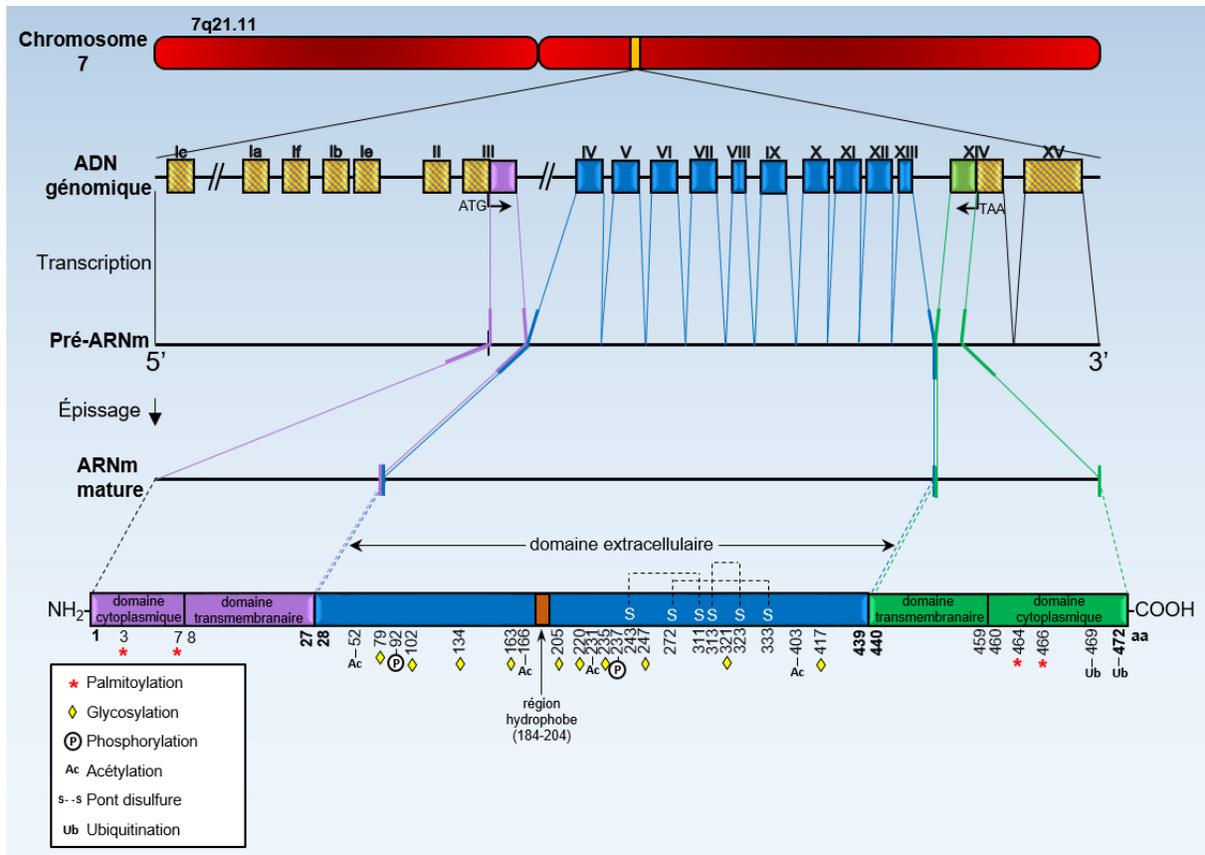
Figure modifiée et traduite de (Lopaschuk et coll., 2010). AGNE, acide gras non estérifié; CPT1, carnitine palmitoyltransférase 1; DGAT, diacylglycérol acyltransférase; FAS, *fatty acid synthase* (synthase des acides gras); GLUT4, transporteur du glucose 4; PDK4, pyruvate déshydrogénase kinase-4; PFK-1, phosphofructo-1-kinase 1; PGC-1 $\alpha$ , co-activateur-1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$ ; PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptor*; RXR, Récepteur X des rétinoïdes; SREBP, *sterol regulatory element binding protein*; TG, triglycérides; VLDL, lipoprotéine de très faible densité (*very low-density lipoprotein*).

Le PPAR $\alpha$  est principalement exprimé dans les tissus qui présentent un taux élevé d'oxydation des acides gras, tels que le foie et les muscles cardiaque et squelettique, et régule l'expression de gènes impliqués dans le catabolisme des acides gras. D'un autre côté, le PPAR $\gamma$  est principalement exprimé dans le tissu adipeux blanc et régule l'adipogenèse (Figure 2). Cela n'exclut pas le fait que ces tissus expriment les deux formes de PPAR, mais dans des proportions différentes. Par exemple, la transcription du récepteur CD36 peut aussi être induite par l'activation de PPAR $\gamma$  dans les cardiomyocytes (Febbraio et Silverstein, 2007; Son et coll., 2007). Les PPAR $\beta/\delta$  sont, quant à eux, plus exprimés durant le stade fœtal et le sont de moins en moins avec l'âge (Abbott, 2009; Echeverria et coll., 2016).

### 1.1.3 Structure génique

Le gène du récepteur CD36 compte 15 exons et est situé sur le chromosome 7q21.11 chez l'homme et le chromosome 5 chez la souris. Les exons 4 à 13 codent pour le domaine extracellulaire du CD36, tandis qu'une partie des exons 3 et 14, codant pour les portions N- et C-terminales, respectivement, codent pour les domaines cytoplasmique et transmembranaire du CD36 (Armesilla et Vega, 1994; Gautam et Banerjee, 2011). Il existe au moins 5 variantes de l'ARNm du CD36 obtenues par épissage alternatif, se retrouvant toutes dans la région non-codante 5' (exons 1c, 1a, 1f, 1b, 1e) (Figure 3) (Andersen et coll., 2006).

La protéine CD36 humaine est constituée de 472 aa et présente 84% d'homologie avec la séquence murine. Sa masse moléculaire prédite est de 53 kDa, mais les modifications post-traductionnelles de glycosylation lui confère une masse moléculaire fonctionnelle de 78-88 kDa (Abumrad et coll., 1993). Du côté N-terminal, les aa 1 à 7 forment une queue cytoplasmique qui possède deux sites de palmitoylation sur les résidus cystéines (Cys) 3 et 7, lui permettant de s'ancrer à la membrane dans les radeaux lipidiques, des microdomaines riches en cholestérol, phospholipides saturés, glycolipides et cavéoline-1 (Figure 4) (Febbraio et Silverstein, 2007; Tao et coll., 1996; Thorne et coll., 2010), et les aa 8 à 27 sont dans une région transmembranaire.



**Figure 3. Représentation du gène et de la protéine du CD36 sous une forme linéaire**

Figure inspirée et traduite de (Gautam et Banerjee, 2011; Pepino et coll., 2014).

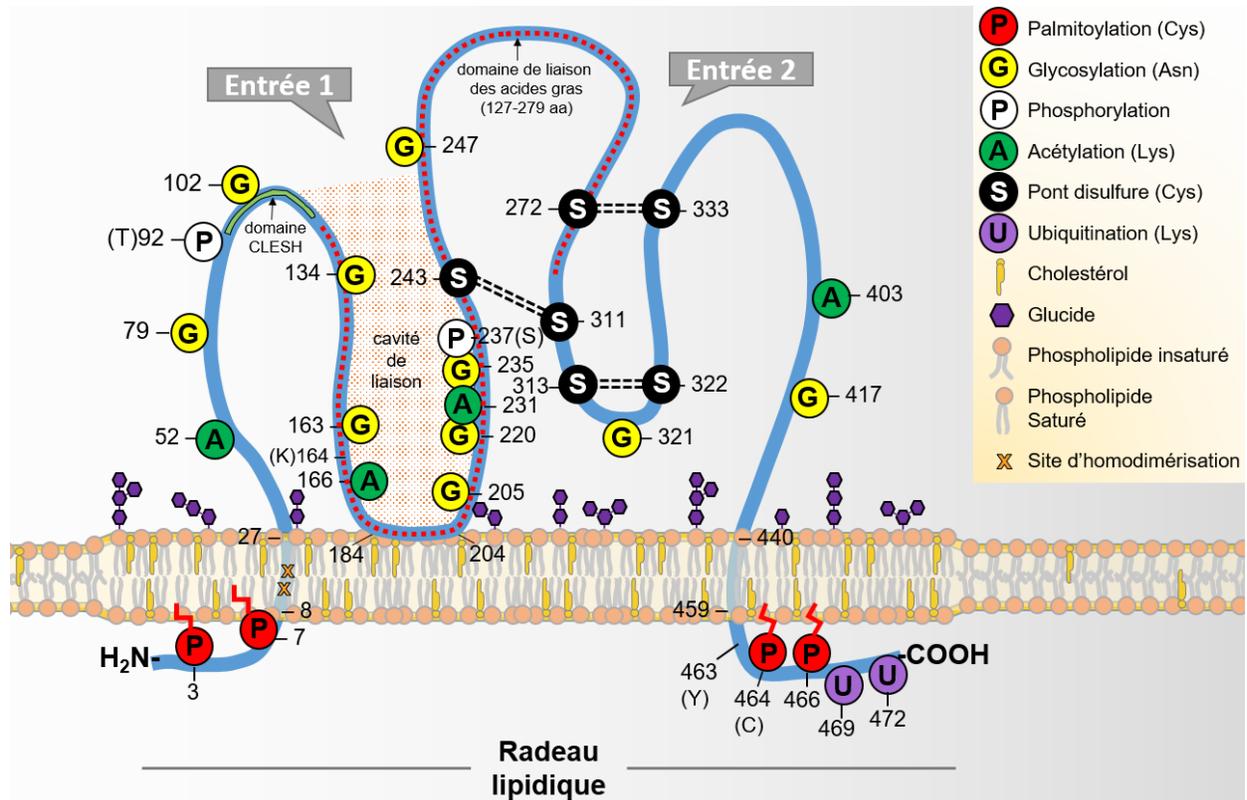
Il a été montré récemment que le domaine transmembranaire du côté N-terminal contient les motifs  $G_{12}XXXG_{16}XXXA_{20}$  et  $A_{20}XXG_{23}$  (G, glycine, A, alanine) permettant l'homodimérisation du CD36 (Wei et coll., 2017). Les aa 28 à 439 forment le domaine extracellulaire qui possède jusqu'à 10 sites de glycosylation sur les résidus asparagine (Asn) 79, 102, 134, 163, 205, 220, 235, 247, 321 et 417 et trois ponts disulfures entre les Cys 243/311, 272/333 et 313/323. La glycosylation du CD36 a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi et elle est nécessaire pour que le récepteur adopte une conformation fonctionnelle (Hoosdally et coll., 2009; Luiken et coll., 2016). Une région hydrophobe est observée au niveau des résidus 184 à 204 et permet l'interaction du CD36 avec la membrane. La région extracellulaire du CD36 comporte aussi deux sites de phosphorylation sur les résidus thréonine (Thr) 92, reconnu par la protéine kinase C (PKC) (Asch et coll., 1993), et sérine (Ser) 237, reconnu par la protéine kinase A (PKA) (Hatmi et coll., 1996). Au niveau des plaquettes,

la Thr92 est constitutivement phosphorylée et cause à la fois une augmentation de la liaison du CD36 avec le collagène, et une diminution de sa liaison avec la TSP en absence de stimulation (Asch et coll., 1993). La phosphorylation de la Ser237, quant à elle, inhibe l'internalisation des acides gras dans les plaquettes (Guthmann et coll., 2002) et les entérocytes (Lynes et coll., 2011). Par contre, la stimulation de la PKA n'affecte pas la fonction d'internalisation du récepteur CD36 des acides gras dans les cardiomyocytes. Cela suggère que la phosphorylation du CD36 n'influence possiblement pas sa fonction dans les muscles cardiaque et squelettique (Luiken et coll., 2002). Des analyses par protéomique et spectrométrie de masse ont révélé que le récepteur CD36 est acétylé sur les résidus Lys 52, 166, 231 et 403, mais les conséquences de ces modifications ne sont pas encore connues (Kuda et coll., 2013; Lundby et coll., 2012). Du côté C-terminal, les aa 440 à 459 traversent la membrane et les aa 460 à 472 forment une autre queue cytoplasmique, avec les deux résidus Cys464 et Cys466 comme sites de palmitoylation et les Lys469 et Lys472 comme sites d'ubiquitination (Smith et coll., 2008). La palmitoylation, la glycosylation et la présence des ponts disulfures affectent la translocation du récepteur CD36 vers la membrane plasmique, puisque des substitutions au niveau des aa concernés diminuent son expression à la surface cellulaire (Pepino et coll., 2014; Thorne et coll., 2010). L'exposition du CD36 à des acides gras stimule sa polyubiquitination par des ubiquitines liées entre elles par la Lys48, induisant ainsi sa dégradation dans les protéasomes. Les acides gras ont donc un effet de rétro-inhibition sur leur internalisation par le CD36, alors que l'insuline inhibe l'ubiquitination et empêche sa dégradation. D'un autre côté, la monoubiquitination ou la polyubiquitination du CD36 par des ubiquitines liées entre elles par la Lys63 pourrait stabiliser son expression à la membrane ou permettre la formation de complexes protéiques, mais le mécanisme reste à être élucidé (Abumrad et Moore, 2011; O'Neill, 2009; Smith et coll., 2008).

Le récepteur CD36 possède plusieurs sites de liaison avec ses ligands. Il a été montré que la TSP-1 se lie d'abord avec le CD36 avec une faible affinité (Leung et coll., 1992), causant le recrutement de la phosphatase alcaline qui déphosphoryle le résidu Thr92 du récepteur. Cela permet ensuite à la TSP-1 de se lier sur le domaine CLESH (*CD36*, *LIMP-2 (liver and steroidogenic organs and is a co-receptor for hepatitis C virus)*, *Emp (epithelial membrane protein) sequence homology*), compris entre les aa 93 à 120, avec une haute affinité (Crombie et Silverstein, 1998; Frieda et coll., 1995). La liaison de haute affinité de la TSP-1 sur le CD36

au niveau des plaquettes cause le recrutement des protéines tyrosine kinase de la famille Src, qui incluent Fyn, Lyn et Yes, au niveau des résidus tyrosine (Tyr) 463 et Cys464 et activent la voie de p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), activant ainsi les plaquettes (Huang et coll., 1991; Martin et coll., 2011; Roberts et coll., 2010).

Les résidus d'aa 139 à 183 forment une cavité de liaison hydrophobe (Neculai et coll., 2013) qui lui permet d'interagir avec de multiples ligands endogènes, tels que les AGCL (Baillie et coll., 1996; Glatz et Luiken, 2018; Pepino et coll., 2014; Tanaka et coll., 2001), les LDLox (Demers et coll., 2004), les phospholipides oxydés (Plox) (Podrez et coll., 2000; Seimon et coll., 2010), le collagène (Asch et coll., 1987; Asch et coll., 1993), les protéines S100A8/S100A9 (Kerkhoff et coll., 2001), les protéines amyloïdes- $\alpha$  et  $-\beta$  (Baranova et coll., 2005; Doens et coll., 2017), les AGE (Zhu et coll., 2012), les cellules apoptotiques (Albert et coll., 1998; Savill et coll., 1992) et les ligands exogènes, tels que les diacylglycérides de bactéries gram positif (Areschoug et Gordon, 2009; Hoebe et coll., 2005), le *plasmodium falciparum* (Yipp et coll., 2003), l'inhibiteur synthétique sulfo-N-succinimidyl oléate (SSO) et les ligands synthétiques dérivés des sécrétagogues de l'HC, tel que l'hexaréline (Glatz et Luiken, 2018). La charge positive de la lysine 164 et, possiblement celle de la lysine 166 dans la cavité de liaison permet la formation d'un lien électrostatique avec les LDLox, les Plox et le SSO qui possèdent une charge négative (Kar et coll., 2008; Pepino et coll., 2014). Plus spécifiquement, les LDLox se lient au niveau de la région 155 à 183 (Puente Navazo et coll., 1996), tandis que les Plox se lient au niveau de la séquence 157 à 171 (Gao et coll., 2010). Les AGCL se lient au CD36 sur une large région qui s'étend entre les aa 127 à 279. Les AGCL chevauchent donc la cavité formée par les aa 139 à 183 et leur groupement carboxyle interagirait aussi électrostatiquement avec le résidu Lys164 du CD36 (Glatz et Luiken, 2018).



**Figure 4. Représentation topologique du récepteur CD36**

C, cystéine; K, lysine; S, sérine; T, thréonine; Y, tyrosine. Figure inspirée et traduite de (Glatz et Luiken, 2018; Yang et coll., 2017).

### 1.1.4 Internalisation du CD36

Le CD36 est un récepteur éboueur qui dépend de la formation de complexes protéiques pour internaliser ses ligands. Certains groupes ont montré que le CD36 est internalisé avec ses ligands dans des cavéoles (Ring et coll., 2006; Truong et coll., 2006; Uittenbogaard et coll., 2000), par macropinocytose (Boyanovsky et coll., 2009), par endocytose médiée par la clathrine (Shamsul et coll., 2010) ou à l'aide d'actine (Collins et coll., 2009). Avec les techniques d'immunoprécipitation, de spectrométrie de masse et de mutagenèse dirigée, une étude a montré que le CD36 forme un complexe avec les intégrines  $\beta 1/\beta 2$  et les tétraspanines CD9/CD81, et se lie avec le récepteur de  $Fc\gamma$  ( $FC\gamma R$ ) qui contient un adaptateur de motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Cela permet le recrutement de SYK (*spleen tyrosine kinase*), qui possède des domaines

en tandem d'homologie au SRC 2 (SH2), et de Src qui se lie aux tyrosines phosphorylées sur ITAM (Heit et coll., 2013). Les kinases Src activent Vav1, une protéine d'échafaudage, qui active par la suite les petites enzymes qui catalysent l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTPases), Rho et Rac. Vav1 recrute aussi la dynamine 2, une protéine impliquée dans la fission des vésicules endosomales, afin de permettre l'endocytose du CD36 et de ses ligands (Rahaman et coll., 2013).

## **1.1.5 Rôles physiologiques**

### **1.1.5.1 Absorption des acides gras à longues chaînes par l'intestin**

Les AGCL sont des acides gras à chaîne aliphatique de 13 à 22 carbones pouvant être saturés ou insaturés (Poulos, 1995; Ratnayake et Galli, 2009; Schonfeld et Wojtczak, 2016). Les AGCL servent de substrats pour divers processus cellulaires, tels que la biosynthèse membranaire, la modification de protéines, la régulation de la transcription ou encore, dans les voies de signalisation et comme source d'énergie (Chabowski et coll., 2007). L'interaction entre les AGCL et le CD36 a été caractérisée indirectement avec la SSO, un dérivé synthétique des AGCL, et le myristate d'isopropyle. Ces molécules, à une concentration de 1 mM, inhibent l'internalisation des acides gras dans des adipocytes (Harmon et coll., 1991). Cette étude a montré que le SSO tritié se lie à une protéine de 85 kDa (Harmon et coll., 1991), qui fut par la suite identifiée comme étant le récepteur CD36 (Harmon et Abumrad, 1993). Le CD36 est capable de lier les AGCL avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Abumrad et Goldberg, 2016; Baillie et coll., 1996) et de faciliter la translocation des acides gras dans la cellule. Selon une étude de cristallisation du CD36, il serait capable de lier au moins deux palmitates, posséderait deux entrées pour les acides gras, et contiendrait un tunnel tout au long de sa structure que les acides gras traverseraient pour pénétrer dans la cellule (Hsieh et coll., 2016) (figure 4).

Le SSO a été utilisé pour la première fois dans une étude sur des adipocytes isolés de rat pour investiguer leur rôle dans l'internalisation des AGCL (Harmon et coll., 1991). Depuis, il a été utilisé comme inhibiteur « spécifique » du CD36, tel que décrit dans plusieurs revues (Coort

et coll., 2002; Kerkhoff et coll., 2001; Kuda et coll., 2013; LuikenSchaap et coll., 1999; LuikenTurcotte et coll., 1999; Pohl et coll., 2005). Le SSO se lie à la lysine 164 dans le domaine de liaison du CD36, empêchant ainsi l'interaction des LDLox et des AGCL avec cet aa (Kuda et coll., 2013). Toutefois, des études récentes ont montré que le SSO inhibe la phosphorylation oxydative mitochondriale (King et coll., 2007) dont l'oxydation du palmitate (HollowayJain et coll., 2009) dans des mitochondries isolées des muscles cardiaque et squelettique, autant chez les souris de type sauvage que celles déficientes en récepteur CD36. Ces études montrent donc que le SSO ne se lie pas spécifiquement au CD36.

Le CD36 est fortement exprimé dans les microvillosités des entérocytes situées dans le duodénum et le jéjunum et son expression diminue plus on s'éloigne dans le tractus intestinal (Lobo et coll., 2001; Nassir et coll., 2007). À ce jour, le mécanisme d'internalisation des acides gras au niveau du tractus intestinal est encore peu connu. Une étude propose que les acides gras sont internalisés avec le CD36 après la formation de vésicules recouvertes de cavéoline-1 et leur endocytose (Siddiqi et coll., 2013; Tran et coll., 2011). Par contre, une étude avec les cellules HEK n'exprimant pas la cavéoline-1 a montré que le CD36 peut quand même faire entrer les acides gras dans la cellule en leur absence (Xu et coll., 2013). Il est possible que les deux mécanismes puissent co-exister, et qu'une partie de l'endocytose du CD36 par son ubiquitination mène à sa dégradation dans les protéasomes afin de réguler l'entrée des acides gras dans la cellule (Tran et coll., 2011). Les entérocytes sont aussi capables d'internaliser le cholestérol par endocytose avec le CD36 (Nassir et coll., 2007) ou à l'aide d'un transporteur du cholestérol, la protéine *Niemann–Pick C1-like 1* (NPC1L1) (Altmann et coll., 2004). Les souris déficientes en CD36 montrent une réduction de 50% de l'internalisation des acides gras et du cholestérol dans la partie proximale de l'intestin (Nassir et coll., 2007; Nauli et coll., 2006). Après leur entrée dans l'entérocyte, les acides gras et le cholestérol sont rapatriés dans le RE pour former des chylomicrons, des lipoprotéines riches en triglycérides (TG). Dans le réticulum endoplasmique, les TG, issues de l'estérification des acides gras, vont s'associer avec l'apolipoprotéine (Apo) B48, l'ApoAIV et les esters de cholestérol pour stabiliser la particule de chylomicron entourée d'une monocouche de phospholipides. La formation d'un complexe du CD36 avec une protéine membranaire associée aux vésicules (VAMP, *vesicle-associated membrane protein*)-7 est requise pour le transport des chylomicrons vers l'appareil de golgi, où

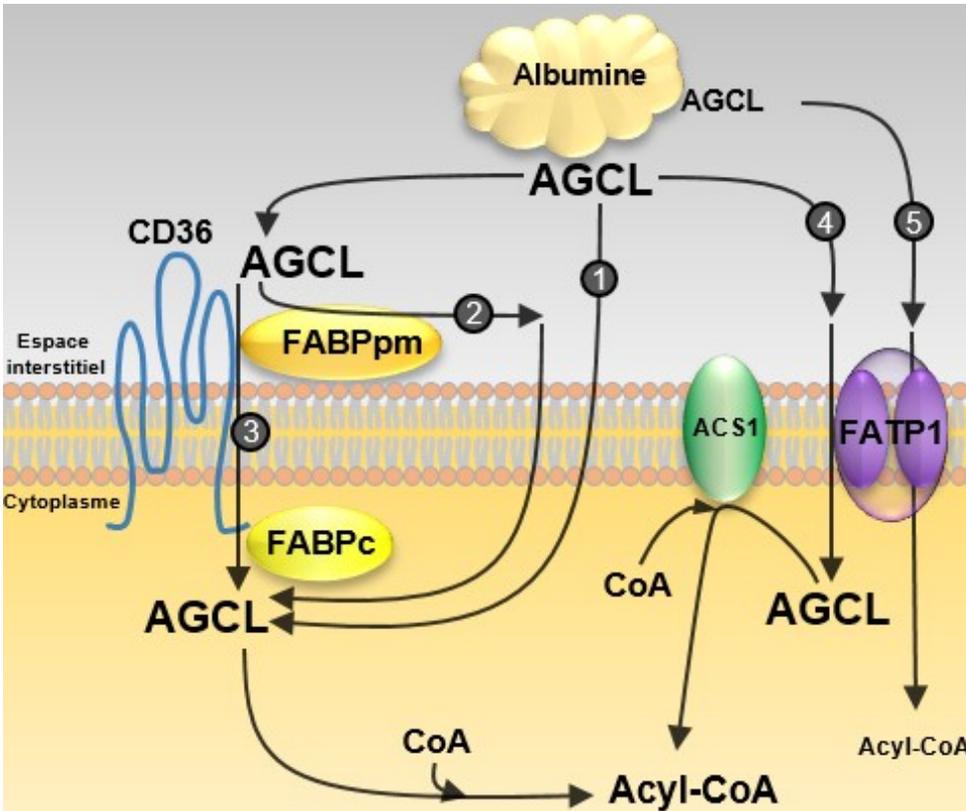
aura lieu l'ajout d'ApoA1 à leur surface et leur maturation (Mansbach et Siddiqi, 2016; Siddiqi et coll., 2013). Le chylomicron mature est ensuite relâché par les entérocytes pour rejoindre la circulation lymphatique (Pepino et coll., 2014). Par la suite, la lymphe se déverse dans la veine sous-clavière, où les chylomicrons rejoignent la circulation sanguine et complètent leur maturation par l'acquisition d'ApoCII et d'ApoE provenant des lipoprotéines de haute densité (HDL, *high density lipoprotein*) circulantes ou sécrétées par le foie. Les ApoCII et ApoE sont importantes pour la reconnaissance des chylomicrons par la lipoprotéine lipase (LPL) dans les tissus périphériques et par le récepteur des lipoprotéines de faible densité (VLDL, *low density lipoprotein (LDL) receptor*) (LDLR) hépatique (Bechmann et coll., 2012). Chez les souris déficientes en CD36, les chylomicrons relâchés par les entérocytes sont de taille plus petite et moins hydrolysés par la LPL (Masuda et coll., 2009). Par conséquent, les TG restent plus longtemps en circulation et leur concentration est plus élevée, en comparaison avec les souris de type sauvage (Drover et coll., 2005). Ce phénotype d'hypertriglycéridémie constitue un facteur de risque pour le développement du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires (Drover et coll., 2005).

#### **1.1.5.2 Transport des acides gras**

Dans le but de trouver si des transporteurs d'acides gras sont présents à la surface membranaire pour réguler l'internalisation des acides gras lors des changements métaboliques, le groupe de Abumrad a utilisé la SSO afin de lier de manière covalente sa cible sur des adipocytes de rats isolés. L'incubation des adipocytes avec la SSO a diminué de 70% la vitesse d'internalisation des acides gras, et ce de manière irréversible. Cette protéine membranaire fut nommée la FAT (Harmon et Abumrad, 1993; Harmon et coll., 1991). C'est en 1993 que le même groupe a découvert que la cible de la SSO, qui présentait un poids moléculaire de 85-88 kDa, était homologue au CD36 (Abumrad et coll., 1993). Peu après cette découverte, un rôle similaire a été démontré pour le CD36 dans le métabolisme des acides gras du myocarde et du muscle squelettique (Van Nieuwenhoven et coll., 1995). De plus, la transfection du CD36 dans des fibroblastes Ob17PY (Ibrahimi et coll., 1996), des myoblastes C2C12 (Bastie et coll., 2004) et du muscle squelettique de rat (Nickerson et coll., 2009) augmente la vitesse d'internalisation des acides gras, renforçant le rôle du CD36 dans la translocation des acides gras. D'autres

protéines membranaires impliquées dans l'internalisation des acides gras ont aussi été identifiées, incluant la protéine de liaison des acides gras à la membrane plasmique (FABPpm, *plasma membrane fatty acid-binding protein*) et cytosolique (FABPc), les protéines de transport des acides gras (FATP, *fatty acid transporter protein*) et possiblement de la cavéoline-1 (Glatz et coll., 2010) (figure 5). Les FATP ont aussi une activité d'acyl-CoA synthase (Houten et Wanders, 2010). Toutefois, le CD36 semble être la protéine membranaire prédominante impliquée dans le transport facilité des AGCL du moins au niveau des adipocytes (Harmon et Abumrad, 1993), des entérocytes (Drover et coll., 2008), des cardiomyocytes (BonnenCampbell et coll., 2004; Kintaka et coll., 2002; Nozaki et coll., 1999) et des myocytes squelettiques (Abumrad et Goldberg, 2016; Glatz et coll., 2016; Kim et Dyck, 2016).

La génération de souris déficientes en CD36 a permis d'étudier sa contribution dans l'internalisation des acides gras dans les différents organes. Les souris déficientes en CD36 présentent des concentrations plasmatiques plus élevées d'environ 30% pour le cholestérol et les TG et d'environ 200% pour les acides gras non-estérifiés (AGNE) circulants (Febbraio et coll., 1999). Les adipocytes des souris déficientes en CD36 présentent une plus petite réserve de TG avec une accumulation de diglycérides (Coburn et coll., 2000).



**Figure 5. Mécanismes d'internalisation des acides gras à chaînes longues.**

Plusieurs hypothèses ont été émises sur le mécanisme d'internalisation des acides gras à travers la membrane plasmique. 1) Les acides gras peuvent se dissocier de l'albumine et traverser la membrane plasmique par diffusion passive de par leur nature hydrophobe. 2) La présence de protéines à la surface membranaire, tels que la FABPpm ou le CD36, permet la liaison des acides gras à ceux-ci et ensuite leur diffusion passive à l'intérieur de la cellule ou 3) leur diffusion facilitée à l'aide du CD36. Une fois à l'intérieur de la cellule, les acides gras sont liés à la FABPc. 4) Les acides gras peuvent être transportés à l'intérieur de la cellule par les FATPs, dont la FATP1, et subséquemment être acylés par l'ACS1 ou 5) directement par l'activité de la synthase d'acyl-CoA des FATPs. ACS, acyl-CoA synthétase; AGCL, acides gras à chaîne longue; FABPc, protéine de liaison des acides gras cytosoliques (*cytosolic fatty acid-binding protein*); FABPpm, protéine de liaison des acides gras de la membrane plasmique (*plasma membrane fatty acid-binding protein*); FATP, protéine de transport d'acides gras (*fatty acid transport proteins*). Figure modifiée et traduite de (SchwenkHolloway et coll., 2010).

L'utilisation des radiotraceurs iodés d'acides gras,  $^{123}\text{I}$ -BMIPP (*15-(p-iodophenyl)-3-(R,S)-methyl pentadecanoic acid*) et  $^{123}\text{I}$ -IPPA (*15-(p-iodophenyl) pentadecanoic acid*), avec la technique de tomographie par émission de positron (TEP), a montré que l'absence de CD36 diminue l'internalisation des acides gras de 50-80% dans le myocarde, de 40-75% dans le muscle squelettique et de 60-70% dans le tissu adipeux, tandis qu'aucun changement n'a été observé dans le foie (Coburn et coll., 2000). Il est à noter que l'activité de la LPL n'est pas modifiée chez les souris déficientes en CD36 et qu'elle conserve sa capacité à hydrolyser les TG pour libérer les acides gras. Le foie n'exprime le CD36 que de manière très faible en condition basale (Kim et Dyck, 2016; LuikenArumugam et coll., 2002), mais peut être exprimé à la hausse dans des situations d'hyperlipidémie, tels que l'obésité et le diabète de type 2, au point de conduire à la stéatose hépatique (He et coll., 2011; Memon et coll., 1999). La réduction de l'internalisation des acides gras chez les souris déficientes en CD36 corrèle avec une diminution de l'oxydation des acides gras dans les muscles cardiaque et squelettique et une oxydation compensatoire plus élevée du glucose (Glatz et coll., 2016).

À la surface membranaire, le CD36 peut interagir avec la FABPpm, ce qui lui permettrait de faciliter sa liaison aux acides gras (Chabowski et coll., 2007). Le CD36 peut lier jusqu'à deux acides gras en même temps (Hsieh et coll., 2016) et les fait ensuite traverser son ectodomaine, dans ce qui ressemblerait à un tunnel, afin de les exposer à la membrane externe de la bicouche des feuillettes de phospholipides, l'étape d'adsorption (Glatz et Luiken, 2018). L'adsorption des acides gras se ferait au niveau des radeaux lipidiques où les acides gras pénètrent dans la cellule par un processus de « *flip-flop* » (Hamilton, 2007; Kamp et coll., 2003; Kamp et Hamilton, 1992), il s'agit de l'étape de translocation. Du côté intracellulaire, le CD36 peut faciliter le transport en servant de site de quai pour la FABPc (Spitsberg et coll., 1995) ou pour l'acyl-CoA synthétase (ACS) (Schneider et coll., 2014). La FABPc joue un rôle clé puisqu'en son absence, une augmentation de l'expression du CD36 n'engendre pas une augmentation de la vitesse d'internalisation des acides gras (Van Nieuwenhoven et coll., 1998). Par contre, l'ajout du groupement CoA sur les acides gras par l'ACS les rend imperméables à la membrane et les emprisonne dans la cellule (BononCampbell et coll., 2004; Bonon et coll.,

2007; Chabowski et coll., 2006). Des études ont montré que le CD36 est aussi présent dans des endosomes de réserve et que cette portion de CD36 peut représenter jusqu'à 50% de son expression totale dans les muscles cardiaque et squelettique (Bonen et coll., 2000; LuikenKoonen et coll., 2002). Lorsque le métabolisme augmente, le CD36 endosomal est transloqué à la membrane afin d'augmenter l'entrée des acides gras. Le CD36 peut donc être vu non pas seulement comme un facilitateur dans le transport des acides gras, mais aussi comme un régulateur de la vitesse de l'internalisation des acides gras (Glatz et Luiken, 2018). Les étapes impliquées dans la translocation du CD36 des endosomes de réserve au sarcolemme seront décrites plus loin dans la section 1.2.1.1.

Des études ont montré que le CD36 est présent à la fois à la membrane plasmique et mitochondriale chez le rats (Campbell et coll., 2004; HollowayBenton et coll., 2009) et chez l'homme (Bezaire et coll., 2006; Holloway et coll., 2006; HollowayLally et coll., 2007; HollowayThrush et coll., 2007; Schenk et Horowitz, 2006). Parmi ces études, certaines ont montré que le CD36 était co-immunoprécipité avec la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1), renforçant la possibilité d'un rôle du CD36 dans l'oxydation des acides gras (Campbell et coll., 2004; Schenk et Horowitz, 2006; Sebastian et coll., 2009). En effet, une étude chez des femmes faisant un exercice d'endurance a montré que l'oxydation des acides gras globale corporelle est en corrélation avec le pourcentage de CD36 co-immunoprécipité avec la CPT1 ( $R^2 = 0,86$ ,  $P < 0,003$ ) mais pas avec la CPT1 seul ( $R^2 = 0,16$ ,  $P = 0,376$ ) (Schenk et Horowitz, 2006).

Dans le muscle squelettique, le CD36 a également été isolé par co-immunoprécipitation avec la CPT1 et l'ACS1 mitochondriale, suggérant un rôle dans l'oxydation des acides gras (Bezaire et coll., 2006; Campbell et coll., 2004; Yoshida et coll., 2013). La contraction musculaire causerait un influx de calcium à travers le canal Cav1.1 activant ainsi la protéine kinase  $Ca^{2+}$ /calmoduline-dépendante II (CaMKII) qui active à son tour la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) et l'*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). Il est connu que l'activation d'AMPK cause la translocation du CD36 au sarcolemme (Samovski et coll., 2015), et cela pourrait aussi expliquer sa translocation à la membrane externe mitochondriale pour promouvoir l'entrée des acides gras dans la mitochondrie (Campbell et coll., 2004). Cette voie n'a pas été étudiée dans le myocarde, mais

la régulation à la hausse de l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie par l'ACS1 suggère qu'une association du CD36 avec l'ACS1 serait possible.

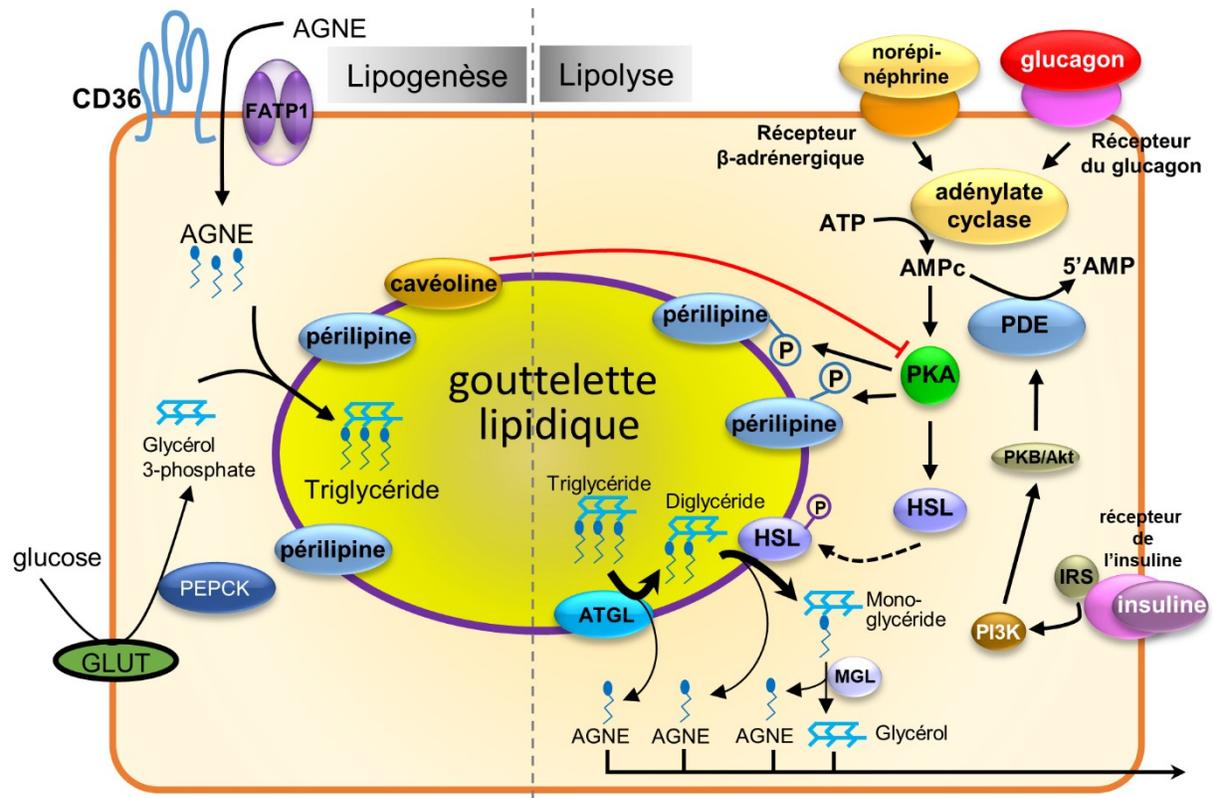
### **1.1.5.3 Le tissu adipeux**

#### **1.1.5.3.1 Emmagasiner des acides gras sous forme de triglycérides**

Les AGCL, sous forme de triglycérides (TG) dans le tissu adipeux, possèdent une haute teneur en énergie par rapport à leur poids et constituent une bonne forme de réserve d'énergie (Glatz et coll., 2010). Une étude en 1993 a montré que l'ajout d'acide oléique et de dexaméthasone dans le milieu de culture a induit la différenciation des pré-adipocytes 3T3-F442A en adipocytes matures qui présentent une augmentation de l'expression de l'acide ribonucléique messager (ARNm) du CD36 (Abumrad et coll., 1993). Cette hausse de l'expression du CD36 concorde avec l'augmentation de l'activité de PPAR $\gamma$ , un régulateur clé dans la différenciation des adipocytes (Koppen et Kalkhoven, 2010; Zhao et coll., 2002).

Dans les adipocytes humains, 80% du CD36 est exprimé au niveau de la membrane plasmique, 20% dans le cytosol au niveau des endosomes et une très faible quantité se retrouve au niveau de la membrane mitochondriale (Allred et coll., 2011). Cette localisation spécifique du CD36 dans les adipocytes appuie son rôle important dans la lipogenèse et de moindre envergure dans l'oxydation des acides gras. L'entrée des acides gras dans les adipocytes se fait tel que décrit dans la section précédente (1.1.5.2 Transport des acides gras et figure 5). Pour emmagasiner les acides gras sous forme de triglycérides, les acides gras doivent être transformés en acyl-CoA, qui seront par la suite transférés sur une molécule d'appui, le glycérol-3-phosphate (G3P). Comparativement au foie (MacLennan et coll., 2006) et aux muscles squelettique et cardiaque (van Hall et coll., 2002), les adipocytes expriment faiblement l'enzyme glycérol kinase qui permet de convertir le glycérol en G3P (Reshef et coll., 2003). Les adipocytes doivent produire le G3P à partir de la conversion de la dihydroxyacétone phosphate issue de la glycolyse par l'enzyme glycérol-3-phosphate déshydrogénase, ou par la conversion de l'oxaloacétate issue du cycle de Krebs par l'enzyme phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C). Trois acyl-CoAs sont ensuite transférés séquentiellement sur le G3P par les enzymes glycérol-3-phosphate

acyl transférase (GPAT), 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT) et diacylglycérol acyltransférase (DGAT) (Ahmadian et coll., 2007) afin de produire un TG (figure 6). Les TG sont accumulés dans des gouttelettes lipidiques qui peuvent occuper jusqu'à 90% du volume total de l'adipocyte (Fei et coll., 2011). Plusieurs protéines se retrouvent à la surface des gouttelettes lipidiques, dont principalement la périlipine, afin de restreindre l'accès des TG aux lipases (Brasaemle et coll., 2000; Greenberg et coll., 1991).



**Figure 6. Lipogenèse et lipolyse dans l'adipocyte**

AGNE, acides gras non-estérifiés; AMPK, protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate; ATGL, lipase des triglycérides du tissu adipeux; FATP, protéine de transport des acides gras; GLUT, transporteur du glucose; HSL, lipase hormono-sensible; IRS, substrat du récepteur de l'insuline; MGL, lipase des monoglycérides; PDE, phosphodiésterase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKA, protéine kinase A. Figure modifiée et traduite de (Duncan et coll., 2007; Rutkowski et coll., 2015).

### 1.1.5.3.2 La relâche des acides gras par la lipolyse

La lipolyse est un processus enzymatique dans lequel les triglycérides contenus dans les gouttelettes lipidiques sont hydrolysés afin de relâcher le glycérol et les acides gras dans la circulation sanguine. Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont couplés aux protéines Gs et une fois activés, cause une augmentation d'AMPc intracellulaire par l'adénylate cyclase (KimXuong et coll., 2005). L'AMPc active la PKA qui pourra ensuite phosphoryler la périlipine, causant son détachement des gouttelettes lipidiques et l'exposition des TG aux lipases (Marcinkiewicz et coll., 2006). De plus, la PKA phosphoryle aussi la lipase hormono-sensible (HSL, *hormone sensitive lipase*), causant sa translocation vers les gouttelettes lipidiques (Egan et coll., 1992). Les TG sont transformés en diglycéride et monoglycéride suite à une hydrolyse séquentielle par la lipase des triglycérides du tissu adipeux (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), la HSL et la lipase des monoglycérides (MGL, *monoglyceride lipase*), respectivement, libérant un acide gras non estérifié à chaque étape et une molécule de glycérol à la fin (figure 6) (Ahmadian et coll., 2007).

En plus du tissu adipeux que l'on retrouve dans l'abdomen et sous la peau, on en retrouve également au niveau du myocarde, à la fois dans le péricarde et dans l'épicarde. Le tissu adipeux du péricarde couvre 80% de la surface du cœur humain et représente 20-50% du poids du myocarde (Ouwens et coll., 2010). Le tissu adipeux de l'épicarde se retrouve au niveau des ventricules gauche et droit, dans les septums atrioventriculaire et interventriculaire et s'étend de l'apex du cœur en longeant les artères coronaires, comptant pour environ 20% du poids d'un cœur humain (Iacobellis et coll., 2005). Dans des conditions physiologiques normales, les tissus adipeux épocardique et péricardique constituent une source d'énergie locale importante pour le myocarde grâce à la relâche des acides gras suite à la lipolyse aidant ainsi le maintien des fonctions contractiles du cœur.

### 1.1.5.3.3 La production des adipokines

Le tissu adipeux n'est pas simplement un organe qui emmagasine de l'énergie comme il a longtemps été décrit, mais il est aussi considéré comme un organe endocrinien capable de produire et de sécréter des protéines bioactives comme les peptides natriurétiques et les

adipokines (Ouchi et coll., 2011). La leptine est l'une des premières adipokines identifiées produites par le tissu adipeux (Conde et coll., 2011; Zhang et coll., 1994). La leptine agit sur son récepteur qui se retrouve au niveau du noyau arqué et de l'hypothalamus, causant l'inhibition de l'appétit (Mercer et coll., 1997). Son action s'oppose donc à celle de la ghréline qui stimule la prise alimentaire (Trayhurn et Bing, 2006). Chez les sujets obèses, on observe une augmentation de la production d'adipokines pro-inflammatoires, tels que le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-6 (IL-6) et l'IL-1 $\beta$  par le tissu adipeux, exacerbant les maladies cardiovasculaires et les désordres métaboliques. D'un autre côté, l'adiponectine est une adipokine anti-inflammatoire qui protège contre les maladies cardiovasculaires, telles que l'IAM, l'athérosclérose, l'obésité et le diabète (Lau et coll., 2017).

La transcription de l'adiponectine est régulée principalement par PPAR $\gamma$ . Puisque le récepteur CD36 contribue majoritairement à l'entrée des acides gras dans la cellule et que ces derniers sont des ligands endogènes de PPAR $\gamma$ , le CD36 joue un rôle important dans la production de l'adiponectine (Hajri et coll., 2007). En effet, chez les souris déficientes en CD36, on observe une diminution de 60% de l'adiponectine en circulation, ainsi que de l'expression de son ARNm dans le tissu adipeux lié à une activité basale et en réponse aux acides gras diminuée (Hajri et coll., 2007). Chez les humains, un polymorphisme dans la région promotrice du CD36 conduit à une diminution de 17% de la concentration circulante d'adiponectine (Lepretre et coll., 2004). Une fois traduite, l'adiponectine subit une maturation par la formation de complexe oligomérique à l'aide de ponts disulfures dans le réticulum endoplasmique pour donner des trimères, des hexamères ou encore des multimères de 12-18 protomères de haut poids moléculaire (Wang et coll., 2008). L'adiponectine est reconnue pour ses effets cardioprotecteurs qui seront détaillés dans la section 1.2.3.4.3 suite à la description des événements de l'I/RM dans la section 1.2.3.

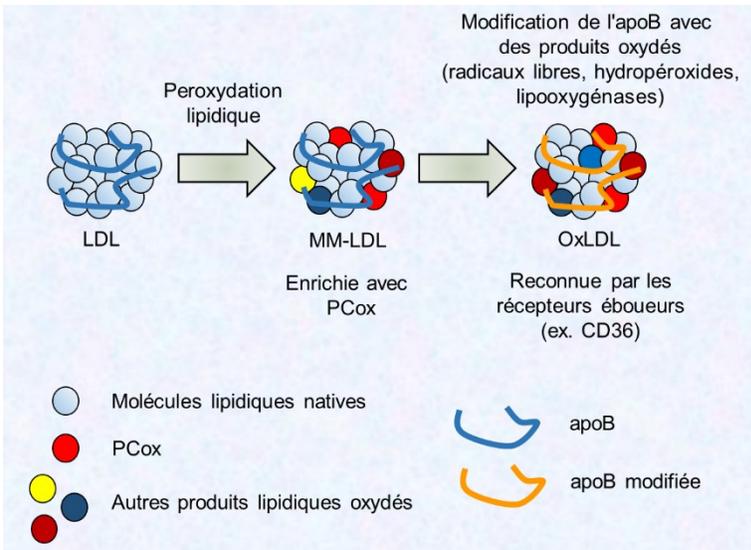
#### **1.1.5.4 Rôle éboueur du CD36 exprimé sur les macrophages**

##### **1.1.5.4.1 LDLox et phospholipides oxydés**

La première étude qui a montré que le CD36 lie les LDLox a été faite avec des cellules HEK293 transfectées avec le CD36 et incubées avec des LDLox marquées à l'iode 125 (Endemann et coll., 1993). Le CD36 a présenté une haute affinité avec une constante de dissociation ( $K_D$ ) de 2-3 nM pour le LDLox. L'étude a conclu que puisque les macrophages sont responsables de l'internalisation des LDLox et de la formation des cellules spumeuses dans le développement de l'athérosclérose, mais qu'ils expriment faiblement le LDLR et fortement le CD36, alors le CD36 est responsable de l'internalisation des LDLox (Endemann et coll., 1993). Une étude récente sur des cellules HEK293 transfectées avec le CD36 a montré que sa liaison aux LDLox requiert d'abord sa liaison avec des acides gras, tels que l'oléate, l'élaïdate et le palmitate. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la liaison du CD36 avec un ou plusieurs de ces acides gras permet un changement de conformation du CD36, permettant ainsi la liaison d'un LDLox (Jay et coll., 2015).

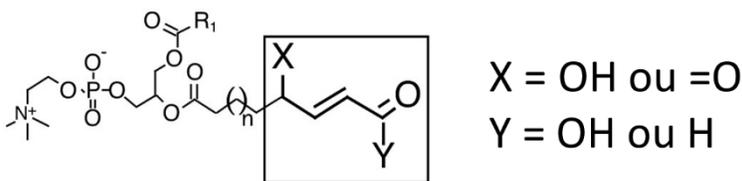
Suite à l'identification du CD36 comme récepteur des LDLox, une étude a montré que le CD36 reconnaît notamment des PLox dans les LDLox (Podrez et coll., 2000). Les phospholipides sont composés d'acides gras liés à une molécule de glycérol qui contient un groupement polaire formé d'un phosphate lié à une base et sont des composants essentiels des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Les phospholipides sont susceptibles d'être oxydés dans les parois vasculaires par les radicaux libres ou des enzymes, tels que la myéloperoxydase, la lipoxygénase et les synthases d'oxyde nitrique (NOS, *nitric oxide synthase*), qui génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) et des espèces réactives de l'azote (RNS, *reactive nitrogen species*) (figure 7) (Hansson, 2001; Park, 2014). L'accumulation de PLox est observée dans des situations de stress oxydatif, telles que l'inflammation, la nécrose et l'apoptose (Leitinger, 2003). L'oxydation des phospholipides cause un changement de conformation qui les fait dépasser de la structure membranaire et qui permet ainsi leur interaction avec les récepteurs éboueurs, tel que le CD36 (Greenberg et coll., 2008). Plus spécifiquement, l'équipe de Hazen a montré que le CD36 reconnaissait les phosphatidylcholines (PC) dans les LDLox dont l'acide gras insaturé (groupe acyl) en position *sn-2* a été oxydé, générant un composé présentant un acide carboxylique ou aldéhyde avec une liaison double en position  $\alpha,\beta$  et un alcool ou une cétone en position  $\gamma$  ( $\gamma$ -hydroxy(ou oxo)- $\alpha,\beta$ -carbonyl insaturé) (PCox) dans les LDLox (Figure 8) (Podrez et coll., 2000; Podrez et coll., 2002; Sun et coll.,

2006). L'internalisation trop importante de LDLox par les macrophages exprimant le CD36 peut conduire au développement de l'athérosclérose, une pathologie qui est la cause principale de l'IAM (Ambrose et Singh, 2015; Badimon et coll., 2012). La pathologie de l'athérosclérose sera détaillée plus loin dans la section 1.1.7.2.



**Figure 7. Oxydation des LDLs circulants**

Le récepteur CD36 lie les LDL oxydées (LDLox) avec une grande affinité. apoB, apolipoprotéine B; LDL, lipoprotéine de faible densité; MM, minimalement modifié; PCox, phosphatidylcholine oxydée. Figure modifiée et traduite de (Alique et coll., 2015; Itabe et coll., 2011).

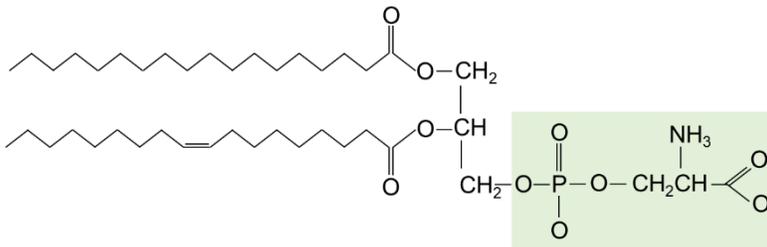


**Figure 8. Structure des PCox liant le CD36**

Figure tirée de (Podrez et coll., 2002).

#### 1.1.5.4.2 La phosphatidylsérine oxydée

La phosphatidylsérine (PS) est un phospholipide anionique qui contient une sérine sur le troisième carbone de la molécule de glycérol (Figure 9). Les PS sont exprimées dans le feuillet intérieur de la membrane plasmique et une flippase les maintient du côté cytosolique de la cellule (Hankins et coll., 2015). Après l'activation de l'apoptose ou suite à un stress, tel que l'IAM, la flippase devient inactive et la PS pivote alors du côté extracellulaire à l'aide d'une scramblase (Krijnen et coll., 2010). De plus, son expression du côté extracellulaire la rend vulnérable à l'oxydation. Une modification similaire aux PCox serait présente dans les phosphatidylsérines oxydées, permettant au CD36 exprimé sur les macrophages de lier les cellules apoptotiques avec une plus haute affinité (Canton et coll., 2013; Silverstein et coll., 2010), et avec l'aide du récepteur de la vitronectine, l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (CD61), initie la phagocytose de cellules apoptotiques (Febbraio et coll., 2001). Il est à noter que les macrophages polarisés du type M2 expriment plus le récepteur CD36 (FadokWarner et coll., 1998) et sont plus aptes à phagocyter les cellules apoptotiques (Xu et coll., 2006; Zizzo et coll., 2012). Ceci suggère que le CD36 possède des fonctions anti-inflammatoires, bien qu'il est plus connu pour sa fonction de lier les LDLox et les lipides présents dans la membrane de bactéries, causant ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires chez les macrophages de type M1 (Canton et coll., 2013; Kennedy et coll., 2011).



**Figure 9. Structure de la phosphatidylsérine**

Figure tirée de (Birge et coll., 2016).

#### 1.1.5.5 Rôle du CD36 sur les plaquettes

La TSP-1 est une glycoprotéine homotrimérique (Adams et Lawler, 2004) qui est reconnue par son motif TSR (*thrombospondin type 1 repeats*) par le domaine CLESH du CD36

au niveau des plaquettes (Klenotic et coll., 2013). Lors d'un IAM, la phase aigüe de la réponse inflammatoire est caractérisée par une accumulation de neutrophiles au site de l'infarctus. Les neutrophiles sécrètent plusieurs protéines dans le milieu, dont la TSP-1. Par la suite, ce sont les monocytes qui arrivent au foyer de la lésion et qui se différencient en macrophages. Les macrophages sont responsables d'amplifier la réponse inflammatoire, mais servent aussi à l'élimination des débris tissulaires au foyer inflammatoire (Kirk et Cingolani, 2016). La TSP-1 agit comme un pont entre les macrophages et le CD36, ainsi qu'avec les neutrophiles qui expriment le CD47 (Lopez-Dee et coll., 2011). Cette interaction aura comme effet de faciliter la phagocytose des neutrophiles qui ont enclenché le processus d'apoptose, afin de faire régresser l'inflammation (Ortiz-Masia et coll., 2012).

### **1.1.6 Déficience humaine en CD36**

Après une première publication montrant que des sujets japonais étaient déficients en CD36 (Nozaki et coll., 1995), une autre étude a montré que 3 à 5% des populations d'Asie et d'Afrique présentent une déficience en CD36 spécifiquement au niveau des plaquettes (Kashiwagi et coll., 1995) et que chez 10% de ces personnes, représentant 0,3 à 0,5% de ces populations, la déficience en CD36 est globale (Silverstein et Febbraio, 2000; TanakaNakata et coll., 2001). Avec les macrophages de ces sujets humains déficients en CD36, il a été montré qu'il y avait une baisse de l'internalisation des LDLox marquées à l'iode 125 de 40% chez ceux-ci comparativement aux macrophages des sujets témoins (Nozaki et coll., 1995), concordant avec une étude précédente qui montrait une diminution de l'internalisation des LDLox de 50% dans les plaquettes et les macrophages humain THP-1 traités avec un anticorps anti-CD36 (Endemann et coll., 1993). Les sujets humains déficients en CD36 présentent des taux circulants de AGNE et de TG plus élevés et sont plus à risque de développer des maladies cardiovasculaires (Ma et coll., 2004; Yuasa-Kawase et coll., 2012).

### **1.1.7 Rôles pathologiques**

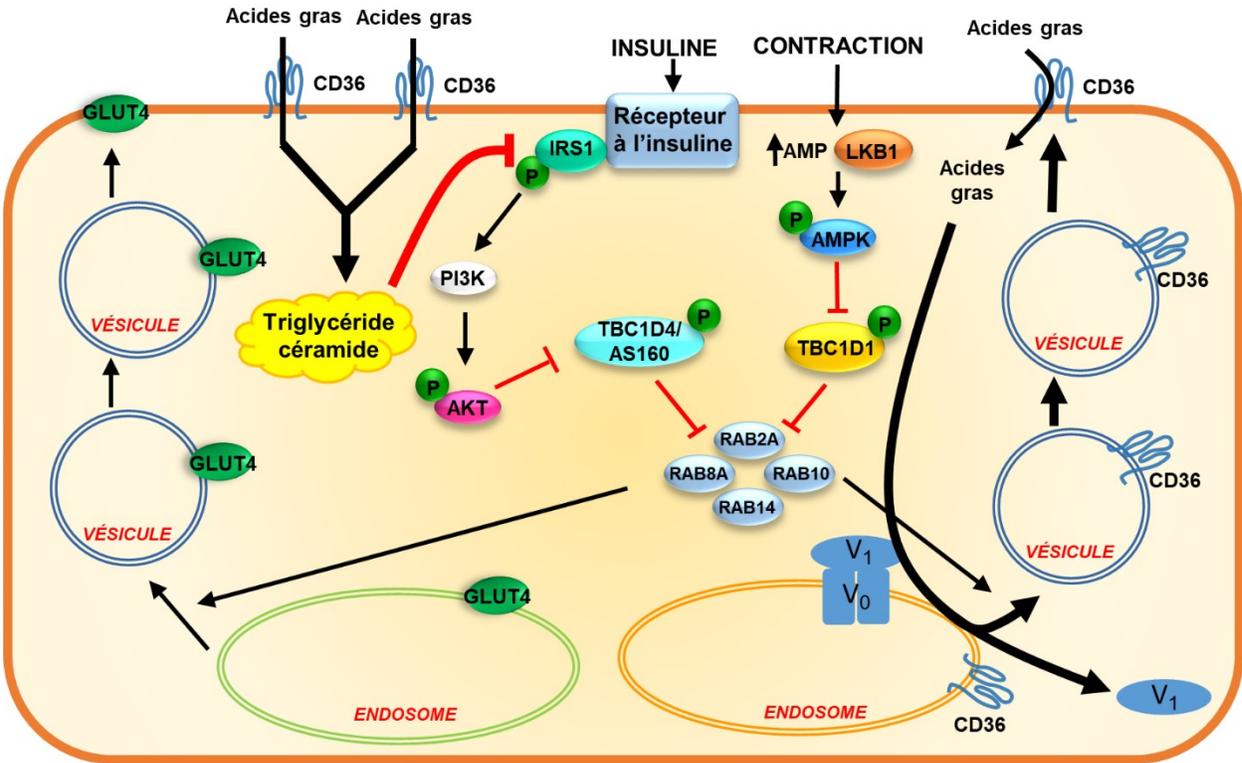
Dans les sections précédentes, il a été mentionné que le CD36 est impliqué dans la pathogenèse de plusieurs pathologies dont l'obésité, le diabète, l'athérosclérose, l'IAM,

l'accident vasculaire cérébral (AVC), la dégénérescence maculaire, l'alzheimer et la malaria. Les sections suivantes feront un survol du rôle du CD36 dans les pathologies qui sont en lien avec la thèse qui porte sur l'I/RM.

#### **1.1.7.1 L'obésité et le diabète**

Plusieurs maladies chroniques sont caractérisées par une perturbation du métabolisme des lipides. Par exemple, l'obésité présente une perte de la régulation du métabolisme du glucose et des acides gras, menant à un profil lipidique plasmatique athérogénique et à une accumulation délétère de TG dans le foie, le cœur et le muscle squelettique. Par conséquent, les individus obèses sont à haut risque de développer une résistance à l'insuline qui peut mener au développement du diabète de type 2 et à des complications cardiovasculaires, telles que l'IAM et la cardiomyopathie diabétique (Abdurrachim et coll., 2015; Zlobine et coll., 2016). L'implication du CD36 dans la régulation du métabolisme des acides gras dans des situations de surcharge lipidique fait de lui une cible thérapeutique attrayante dans l'étiologie de la lipotoxicité et de la résistance à l'insuline induite par l'obésité ou une diète riche en lipides (Glatz et coll., 2010; Liu et coll., 2016). La surcharge chronique d'acides gras au cœur et aux muscles initie un changement dans le recyclage du CD36 et cause sa relocalisation permanente des endosomes de réserve à la membrane sarcolemmique. Une étude chez le rat soumis à une diète riche en lipides a montré que l'utilisation d'une diète riche en lipides s'accompagne d'une relocalisation permanente du CD36 vers le sarcolemme en seulement deux à trois jours, ainsi que d'une augmentation de la vitesse d'internalisation des acides gras dans les cellules musculaires (Bonen et coll., 2015). De façon similaire, au niveau des muscles de rats obèses Zucker ou d'hommes souffrants d'obésité ou de diabète de type 2, le récepteur CD36 est transloqué de manière permanente à la membrane sarcolemmique, puisqu'une stimulation à l'insuline ou une augmentation de la contractilité n'augmente pas son expression à la membrane sarcolemmique et que son niveau d'expression protéique totale est similaire à celui d'un sujet sain (BonenParolin et coll., 2004; Han et coll., 2007; Luiken et coll., 2001). Le mécanisme moléculaire qui mène à la translocation permanente du CD36 au sarcolemme n'a pas encore été élucidé, mais il conduira non seulement à un métabolisme axé presque uniquement sur l'utilisation des acides gras comme substrat énergétique, et à la formation excessive de TG, de

diglycérides et de céramides dans les muscles squelettique et cardiaque. Dans ces tissus, il a été montré qu'une concentration intracellulaire trop importante de diglycérides et de céramides inhibe la signalisation de l'insuline, empêchant ainsi la translocation du transporteur du glucose 4 (GLUT4, *glucose transporter type*) des endosomes au sarcolemme (figure 10) (Chabowski et coll., 2006). Par conséquent, moins de glucose entre dans la cellule et moins de glycogène est produit. À ce stade, le muscle est devenu résistant à l'insuline et développe une dysfonction contractile (Bonen et coll., 2015; Glatz et coll., 2016). Le CD36 joue donc un rôle important dans la phase précoce du développement de la résistance à l'insuline lors d'une surcharge en lipides. Lors de la reperfusion suite à un IAM, la forte présence du récepteur CD36 au sarcolemme chez les sujets obèses et diabétiques favorise l'entrée et l'oxydation des acides gras au détriment du glucose, ce qui mène à un rapport de production d'ATP par consommation d'oxygène moins efficace et exacerbe les dommages à la reperfusion (voir section 1.2.3.2.1 pour plus de détails). Des études ont montré que l'inhibition du CD36 par le SSO (Coort et coll., 2002) ou la délétion du CD36 (SteinbuschLuiken et coll., 2011) protège les muscles contre la résistance à l'insuline et la dysfonction contractile induites par une diète riche en lipides. Il est intéressant de noter qu'une étude a montré que l'expression du CD36 est augmentée au niveau des macrophages différenciés à partir de monocytes humains en présence de concentrations élevées de glucose dans le milieu (Griffin et coll., 2001). Puisque le CD36 peut lier et causer l'internalisation des LDLox, l'augmentation de l'expression du CD36 chez les personnes atteintes d'obésité ou de diabète les rend plus à risque de développer l'athérosclérose. Une étude récente chez le rat soumis à une diète riche en lipides a montré qu'une surcharge en lipides inhibe l'activité de la pompe à protons H<sup>+</sup>-ATPase (ATP, adénosine triphosphate) vacuolaire (v-ATPase) en causant la séparation de la sous-unité ATPase cytosolique (V<sub>1</sub>) du canal de protons (V<sub>0</sub>). L'étude suggère que l'alcalinisation des endosomes de réserve cause la translocation de ceux-ci au sarcolemme et cela expliquerait le mécanisme menant au développement de la résistance à l'insuline (LiuSteinbusch et coll., 2017).



**Figure 10. Désensibilisation à l'insuline dans les cardiomyocytes chez les individus atteints d'obésité**

Cer, céramide; DAG, diacylglycéride; GLUT, transporteur du glucose; IRS, substrat du récepteur de l'insuline; LKB1, *liver kinase B1*; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; TBC1D, *Tre-2/Bub2/Cdc16* domain family member; TG, triglycéride; V<sub>0</sub>, canal de protons V<sub>0</sub>; V<sub>1</sub>, ATPase cytosolique V<sub>1</sub>. Figure modifiée et traduite de (Chanda et coll., 2016; Glatz et Luiken, 2018).

### 1.1.7.2 L'athérosclérose

Les cellules endothéliales qui tapissent les artères peuvent répondre à des stimuli mécaniques et moléculaires, permettant de réguler le tonus (Luscher et coll., 1991), l'homéostasie (Dahlback, 2000) et l'inflammation (Luscinskas et Gimbrone, 1996) dans la circulation sanguine. L'une des étapes initiales dans le développement de la pathologie de l'athérosclérose est le dysfonctionnement des cellules endothéliales artérielles dans les régions soumises à des forces de cisaillement et à un flux sanguin turbulent, tels qu'au niveau des embranchements et des repliements artériels (Davies, 1995; Gimbrone et coll., 2000). Dans ces régions plus susceptibles au développement de l'athérosclérose, les voies de signalisation qui

mènent à l'activation des enzymes eNOS, responsables de la production de l'oxyde nitrique (NO) qui maintient la barrière endothéliale, et de la superoxyde dismutase (SOD) qui réduit le stress oxydatif cellulaire, sont diminuées (Gimbrone et Garcia-Cardena, 2013; SenBanerjee et coll., 2004; Topper et coll., 1996). Par conséquent, les cellules endothéliales dans ces régions sont de forme cuboïde, ont une mince couche de glycocalyx et forment un alignement désordonné (Gimbrone et coll., 2000; Gouverneur et coll., 2006; Nerem et coll., 1981). L'intégrité de la barrière endothéliale étant compromise à ces endroits, cela fait en sorte que les LDLs, les VLDLs et les chylomicrons sont plus susceptibles de s'insérer sous la couche de cellules endothéliales et de s'y accumuler (Linton et coll., 2000; Schwenke et Carew, 1989). Une concentration circulante élevée en cholestérol, contenu principalement dans les LDLs, est reconnue comme étant un facteur de risque important de l'athérosclérose (FERENCE et coll., 2017; Linton et coll., 2000). Le foie synthétise et sécrète des lipoprotéines de très faible densité (VLDL, *very low density lipoprotein*) riches en TG et en esters de cholestérol. Contrairement aux chylomicrons qui expriment une molécule d'apoB48 lors de leur synthèse par les entérocytes, les VLDLs expriment une molécule d'apoB100 (Anant et Davidson, 2002) et vont maturer avec l'acquisition des apoE, apoCII et apoCIII à partir des HDLs circulants. L'hydrolyse et la libération des TG et des esters de cholestérol aux tissus extrahépatiques transforment progressivement les VLDLs en lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), et éventuellement en LDLs qui sont riches en esters de cholestérol. La LDL est considérée comme étant la lipoprotéine ayant le plus d'effets néfastes pour la santé, conduisant aux maladies cardiovasculaires, principalement dû au fait qu'elle est la plus susceptible de s'accumuler dans l'intima et de se faire oxyder (Staprans et coll., 2003). Dans les cellules endothéliales activées, l'activité réduite d'eNOS diminue la production de NO qui lève son effet inhibiteur sur le facteur nucléaire kappa B (NFκB, *nuclear factor kappa B*) et qui cause la transcription de protéines d'adhérence endothéliales, tels que VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) et P-sélectine, de récepteurs pro-inflammatoires, tel que TLR2 (*toll-like receptor 2*), et de cytokines, tels que CCL2 (*chemokine C-C motif ligand 2*) et IL-8 (Hamik et coll., 2007; SenBanerjee et coll., 2004; Yurdagul et coll., 2013). De plus, le NFκB cause aussi la transcription de la xanthine oxydase, de la sous-unité gp91phox de la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) réduit) oxydase (ou NOX2) et d'iNOS impliqués dans la production de ROS qui peuvent oxyder les lipoprotéines qui sont à

proximité et produire des LDLox (Steinbrecher, 1988; Ungvari et coll., 2006). L'inflammation chronique observée dans certaines conditions pathologiques, telles que l'obésité et le diabète, peut aussi contribuer à la formation de LDLox pouvant être piégées dans l'espace sous-endothélial des artères (Gautam et Banerjee, 2011). Les LDLox (Cominacini et coll., 2000), ainsi que d'autres stimuli tels que les cytokines (Collins et coll., 1995), les AGEs (Park et coll., 2011) et les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) (Dauphinee et Karsan, 2006), peuvent activer les cellules endothéliales avoisinantes et les prédisposer à développer l'athérosclérose (Linton et coll., 2000).

L'activation des cellules endothéliales recrute les monocytes dans une cascade d'évènements qui inclut séquentiellement la roulade, l'adhésion, l'activation et la diapédèse des monocytes à travers les cellules endothéliales. La roulade permet l'interaction entre les monocytes et les cellules endothéliales, principalement par la P-sélectine, afin de ralentir leur parcours. Par la suite, les monocytes adhèrent de manière plus ferme sur les cellules endothéliales par l'interaction des VCAM-1 et ICAM-1 avec les intégrines leucocytaires (Galkina et Ley, 2007). La migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial est induite par des facteurs chimioattractants, tels que le CCL2 et l'IL-8 (Boisvert et coll., 1998; Gerszten et coll., 1999; Gu et coll., 1998). Chez la souris, les monocytes qui présentent le marqueur Ly6C<sup>hi</sup> vont préférentiellement migrer dans l'espace sous-endothélial et maturer en macrophages pro-inflammatoires de type M1, en comparaison aux monocytes qui présentent le marqueur Ly6C<sup>lo</sup> (Libby et coll., 2013; Swirski et coll., 2007; Swirski et coll., 2009). Les macrophages vont internaliser les LDLs accumulés dans la couche sous-endothéliale, les dégrader dans les lysosomes, alors que l'excès de cholestérol est envoyé dans le RE pour être estérifié en ester de cholestérol. Les esters de cholestérol sont par la suite relâchés dans le cytosol et s'y accumuleront sous forme de gouttelettes lipidiques, une caractéristique des cellules spumeuses (Brown et Goldstein, 1983; Brown et coll., 1979). L'accumulation de cellules spumeuses conduit à la formation d'une strie graisseuse des plaques athéromateuses dans la tunique intima des artères (Linton et coll., 2000). L'activation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), des neutrophiles et des macrophages cause l'activation des enzymes oxydantes, telles que la myéloperoxydase (Hazen et Heinecke, 1997), la xanthine oxydase (George et Struthers, 2009), la NADPH oxydase (Aviram et coll., 1996) et iNOS (*inducible*

*nitric oxide synthase*) (Miyoshi et coll., 2006), qui peuvent oxyder les LDLs. Les LDLox se lient avec une plus grande affinité envers le CD36 présent sur les macrophages qui favorise leur internalisation et la formation de cellules spumeuses (Moore et Freeman, 2006; Younis et coll., 2008). En effet, parmi les nombreux récepteurs éboueurs exprimés par les macrophages, le CD36 et le récepteur éboueur de classe A (SR-A1, *scavenger receptor A1*) sont responsables de l'internalisation de la majorité des LDLox, soit une baisse de 75-90% d'internalisation des LDLox chez les macrophages péritonéaux *in vitro* de souris SR-A1 et CD36 double déficientes (Kunjathoor et coll., 2002). *In vivo*, les souris double déficientes en CD36 et en apoE présentent entre 61% et 76% moins de lésions aortiques que les souris déficientes en apoE seulement (Febbraio et coll., 2000; Kuchibhotla et coll., 2008). Dans une autre étude, la transplantation de moelle osseuse de souris double déficientes en CD36 et en apoE chez des souris déficientes en apoE et irradiées a diminué les lésions de 88%, tandis que la transplantation de moelle osseuse de souris déficientes en apoE chez des souris double déficientes en CD36 et en apoE et irradiées a augmenté les lésions de 110% (Febbraio et coll., 2004). Dans notre laboratoire, un traitement prolongé avec le EP 80317, un ligand sélectif du CD36, a diminué les lésions aortiques de 51% et 65% chez les souris déficientes en apoE, comparativement au groupe traité avec le véhicule (Harb et coll., 2009; Marleau et coll., 2005). De plus, le traitement avec le EP 80317 cause une diminution de la phosphorylation des kinases Src et de leur cible en aval, la kinase d'adhésion focale Pyk2, qui est responsable de la polymérisation de l'actine et qui empêche les macrophages de migrer au site (Harb et coll., 2009). La liaison des LDLox avec le CD36 sur les macrophages active la voie Lyn, MEK kinase 2 (MEKK2) et de JNK1 et JNK2 et la formation subséquente de cellules spumeuses (Rahaman et coll., 2006). Une étude récente a montré que le CD146 interagit avec le CD36 pour l'aider à activer ses voies de signalisation et l'internalisation des LDLox (Luo et coll., 2017). L'internalisation des LDLox par les macrophages augmente l'expression des récepteurs éboueurs et des transporteurs responsable de l'efflux du cholestérol, et active les voies de signalisation pro-inflammatoires conduisant à l'augmentation de la sécrétion de cytokines, de chimiokines et du stress oxydatif, et par conséquent, à l'oxydation davantage de LDLs, l'activation des cellules endothéliales, le recrutement de monocytes et la formation de cellules spumeuses (Adamson et Leitinger, 2011; Bolick et coll., 2009; Brand et coll., 1993; Colin et coll., 2014; Peled et Fisher, 2014; Wang et coll., 2002). En effet, l'internalisation des LDLox augmente la production de 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 (15d-

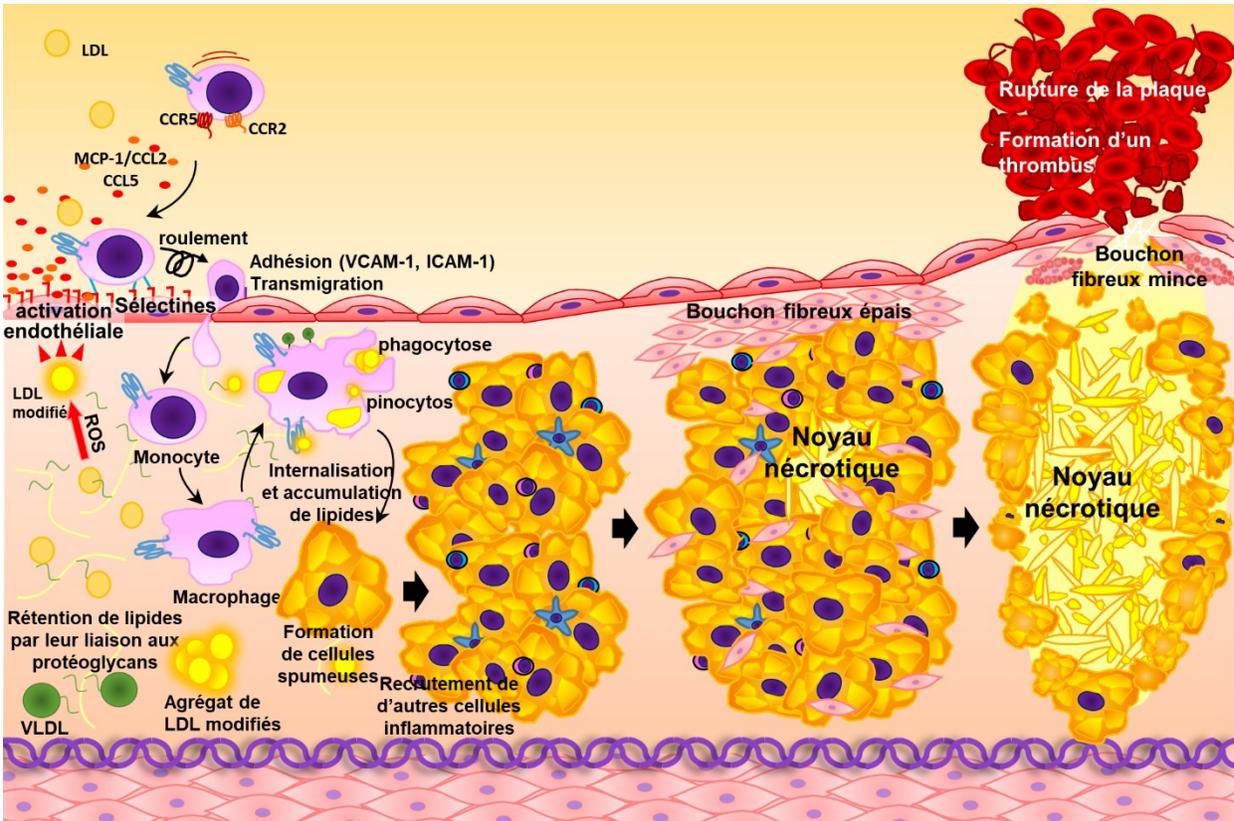
PGJ2) et d'acide 9-hydroxy-10,12-octadécadiénoïque (9-HODE) par la cyclooxygénase-2 (COX-2) ou d'acide 13-hydroxy-9,11-octadécadiénoïque (13-HODE) par la lipoxygénase (Baer et coll., 1991; Huang et coll., 1999; Yoshida et Niki, 2006). Ces métabolites peuvent lier et activer les PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  qui formeront un hétérodimère avec le RXR et se lieront sur le promoteur du CD36 pour initier sa transcription (Bochkov et coll., 2010; Obinata et Izumi, 2009; Rolin et Maghazachi, 2014; Yin et coll., 2009). L'augmentation de l'expression du CD36 cause une augmentation de l'internalisation des LDLox, promouvant ainsi la formation de cellules spumeuses et de lésions athérosclérotiques lorsque la cellule dépasse sa capacité à emmagasiner les LDLox (Febbraio et coll., 2000; Silverstein et coll., 2010). L'internalisation des LDLox stimule en parallèle la transcription du transporteur à cassette liant l'ATP -A1(ABCA1, *ATP binding cassette-A1*), responsable de l'efflux du cholestérol (Taketa et coll., 2008). L'inflammation peut aussi être induite par le cholestérol dans les vésicules ou les gouttelettes lipidiques ou sous forme de cristaux (Tall et Yvan-Charvet, 2015; Ye et coll., 2011) ou par les interleukines IL-1 $\beta$  et IL-18 produites par l'activation de l'inflammasome (Düwell et coll., 2010; Lu et Kakkar, 2014). Il est possible de réduire l'inflammation dans les cellules spumeuses en éliminant le cholestérol. Le HDL est une molécule anti-athérogénique qui capte le cholestérol qui est efflué par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Fioravanti et coll., 2011; Kellner-Weibel et de la Llera-Moya, 2011; Yancey et coll., 2007; Ye et coll., 2011). Dans une étude effectuée par le groupe de Ong, un ligand synthétique du CD36, le EP 80317, a aussi causé l'efflux du cholestérol en activant la voie ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*), COX-2, 15d-PGJ-2 et PPAR $\gamma$ , causant la transcription de ABCA1 mais pas du CD36 (Bujold et coll., 2013).

Les stries graisseuses initialement formées de cellules spumeuses ne causent pas vraiment de complications cliniques et peuvent subir une régression. Toutefois, l'infiltration de CMLV et une progression trop avancée des lésions sont des facteurs qui diminuent la possibilité de régression (Fisher et coll., 2012). La sécrétion de facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, *platelet derived growth factor*) (Raines, 2004), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF, *fibroblast growth factor*) (Yang et coll., 2015) et le facteur de croissance épidermique liant l'héparine (HB-EGF, *heparin binding epidermal growth factor*) (Molloy et coll., 1999), par les macrophages cause la prolifération des CMLV qui sont

déjà présentes dans l'intima (Schwartz, 1999), tandis que la dégradation de la matrice extracellulaire, du collagène et de l'élastine par les métalloprotéinases cause la prolifération des CMLV de la média et leur migration vers l'intima (Johnson, 2007). L'accumulation des CMLV produit une matrice extracellulaire complexe, composée de collagène, de protéoglycanes et d'élastine, qui forme un cap fibreux au-dessus d'un noyau formé de cellules apoptotiques, nécrotiques et de dépôt de cholestérol et de lipides (Bobik, 2006; Libby, 2000). Le cap fibreux sert de barrière pour empêcher la rupture de la plaque et l'exposition de facteurs pro-thrombotiques de la lésion à la circulation sanguine, permettant d'éviter la formation d'un thrombus et des événements cliniques qui s'ensuivent, tels que l'IAM (Ambrose et Singh, 2015; Cleutjens et coll., 2008). En effet, au fur et à mesure que les lésions progressent, les lipides extracellulaires s'accumulent de manière substantielle formant un noyau composé entre autres d'esters de cholestérol libérés suite à la mort des cellules spumeuses (Kruth, 1984; Linton et coll., 2000; Minor et coll., 1989). Cela cause le recrutement et l'accumulation additionnelle de cellules dans l'intima, causant une protrusion de la lésion dans la lumière de l'artère et l'occlusion progressive du vaisseau (Alexander et coll., 2012; Alexander et Owens, 2012; Heusch et coll., 2014). Les plaquettes exprimant le CD36 sont capables de lier les LDLox, causant le recrutement de Fyn et de Lyn, l'activation de la MAP (*mitogen-activated protein*) kinase kinase-4 (MKK4) et de JNK2 et l'activation des plaquettes, accélérant la formation du thrombus (Chen et coll., 2008).

Dans le cas où l'inflammation perdure dans les lésions athéromateuses, la plaque se fragilise et devient plus à risque de se rompre. Dans cette condition, on peut observer un gros noyau nécrotique et un amincissement du cap fibreux (Libby, 2013; Virmani et coll., 2002). Le noyau nécrotique grossit à mesure que les macrophages meurent et que le nombre de cellules apoptotiques dépasse leur capacité à les phagocyter (Tabas, 2010). Les macrophages meurent alors par nécrose et déversent leur contenu de LDLox ainsi que des composants inflammatoires et oxydatifs, engendrant une augmentation de l'inflammation, du stress oxydatif et de la mort des cellules avoisinantes (Thorp et Tabas, 2009). En effet, l'activation des TLR2/4 et du CD36 suite à leur liaison avec les phospholipides oxydés induit la cascade de signalisation pro-apoptotique de MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*) et du facteur de transcription NFkB, causant l'assemblage de la NADPH-oxydase (NOX)-2 et l'activation de

JNK qui active l'apoptose (Seimon et coll., 2010; Tajbakhsh et coll., 2018; Yvan-Charvet et coll., 2010). L'amincissement du cap fibreux est causé en partie par la mort des CMLV suite à la relâche de ligands FAS (*fatty acid synthase*) pro-apoptotiques (Geng et coll., 1997), de cytokines pro-inflammatoires (Boyle et coll., 2003) et de ROS (Fruhworth et coll., 2006; Lee et coll., 2006) par la mort des macrophages. De plus, la diminution de la relâche de facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ , *transforming growth factor  $\beta$* ) par les phagocytes réduit la production de collagène par les CMLV (Fadok et coll., 1998; Tao et coll., 2015). En parallèle, la relâche de métalloprotéinases (Galis et coll., 1995; Quillard et coll., 2014; Schneider et coll., 2008), d'élastases et de cathepsines (Liu et coll., 2004) par les macrophages cause la dégradation des composantes de la matrice extracellulaire et la fragilisation du cap fibreux. La rupture du cap fibreux peut mener à la formation d'un thrombus et d'évènements cardiovasculaires ischémiques (Linton et coll., 2000).



**Figure 11. Étapes dans le développement de l'athérosclérose qui mène à un infarctus aigu du myocarde**

CCL2, *chemokine C-C motif ligand 2*; CCL5, *chemokine C-C motif ligand 5*; ICAM, molécule d'adhérence intercellulaire; LDL lipoprotéine de faible densité, ROS, espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*); VCAM, molécule d'adhérence de cellules vasculaires; VLDL, lipoprotéine de très faible densité. Figure inspirée et traduite de (Linton et coll., 2000).

## 1.2 Le cœur

La prochaine section décrit le métabolisme d'un cœur en condition physiologique normale afin de le comparer à la pathologie de l'I/RM.

### 1.2.1 Métabolisme physiologique d'un cœur sain

Le cœur est un muscle qui bat en moyenne 100,000 fois par jour pour pomper approximativement 10000 kg de sang afin d'approvisionner tout le corps en oxygène et en

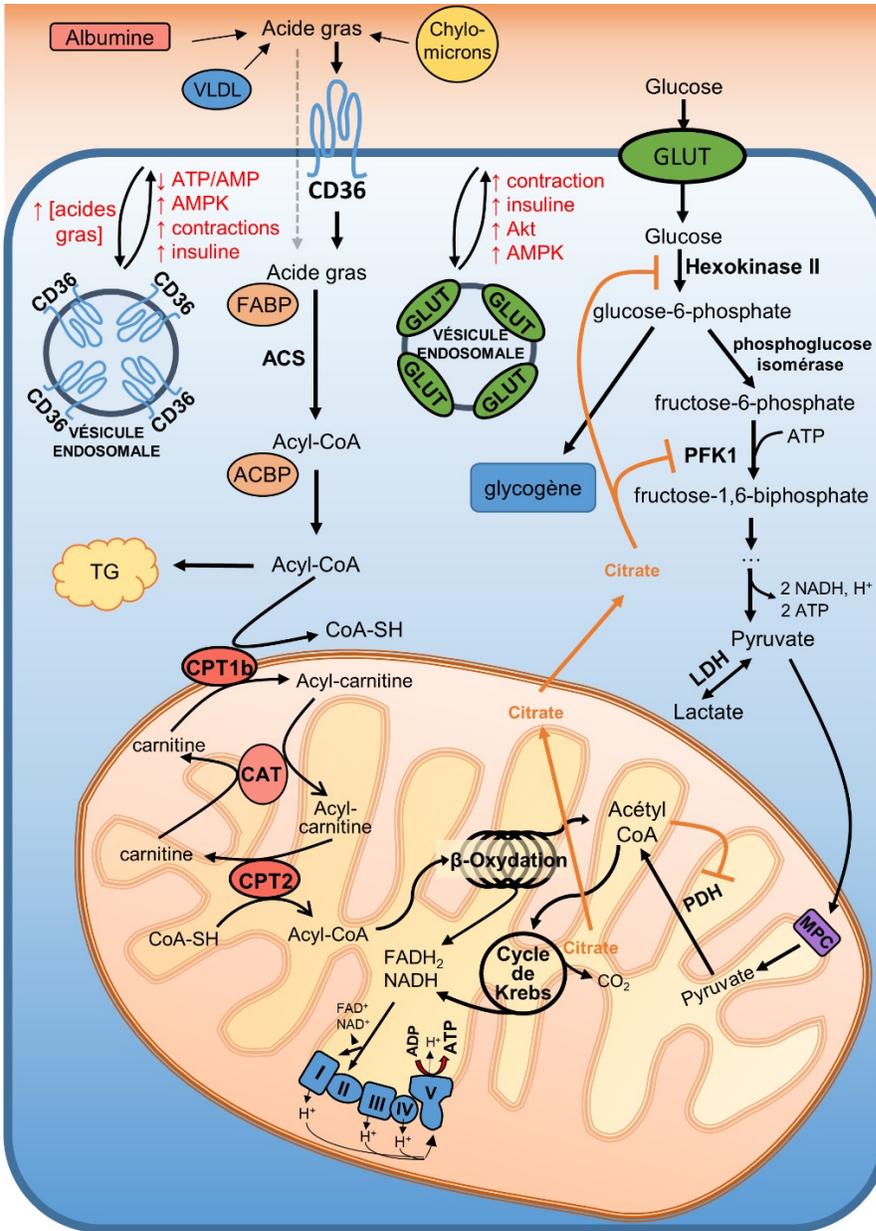
nutriments (Neubauer, 2007). Pour jouer ce rôle crucial, le cœur utilise environ 6 kg d'ATP par jour, ce qui correspond à environ 25 fois son propre poids. Il n'est donc pas surprenant que le myocarde, en condition physiologique, dépende majoritairement du métabolisme aérobie pour produire ce haut niveau d'énergie (Neubauer, 2007). Le cœur utilise principalement les AGNEs, qui constituent de 40 à 60% de ses substrats énergétiques, pour produire de l'ATP afin de maintenir sa fonction contractile. Toutefois, le cœur peut aussi utiliser le glucose et le lactate, qui produisent de 20 à 40% de la production d'ATP qui lui est nécessaire. Dans une moindre mesure, les corps cétoniques et les acides aminés peuvent aussi lui servir comme substrats énergétiques (Lopaschuk, 2017). Bien que les acides gras permettent aux cellules de produire beaucoup d'ATP (129 ATP par molécule de palmitate possédant 16 carbones), cette production consomme 12% plus d'oxygène par molécule d'ATP produite comparativement à l'utilisation du glucose (36 ATP par molécule de glucose possédant 6 carbones) et du lactate comme substrats énergétiques (Lionetti et coll., 2011). Environ 65% de l'ATP produite par le cœur sont utilisés pour sa fonction contractile et le reste est utilisé pour le fonctionnement de ses pompes ioniques. Il existe un équilibre très serré entre la production et l'utilisation de l'ATP dans le cœur. En effet, le cœur ne possède qu'une réserve très faible d'ATP qu'il pourrait utiliser complètement en seulement 10 secondes en condition normale (Stanley et coll., 2005). Le tableau I résume la contribution relative des différentes sources énergétiques que le cœur utilise pour produire de l'ATP dans les conditions physiologiques normales en comparaison avec une situation de reperfusion après une ischémie. Les sections qui suivent vont traiter des voies métaboliques du glucose et des acides gras dans le cœur sain, telles qu'illustrées à la figure 12.

**Tableau I. Contribution relative des différentes voies métaboliques pour produire de l'ATP dans un cœur sain et un cœur reperfusé après une ischémie**

<b>Source</b>	<b>Voie métabolique</b>	<b>Condition physiologique</b>	<b>Coeur reperfusé après une ischémie</b>
Acides gras	$\beta$ -oxydation	40-60%	60-90%
Glucose	Glycolyse	2-8%	10-20%
Lactate	Oxydation du lactate	10-15%	5-10%
Pyruvate*	Oxydation du glucose	20-40%	5-10%
Cétones	Oxydation des cétones	10-15%	10-15%
Acides aminés	Catabolisme des acides aminés	1-2%	1-2%

\*La source de pyruvate provient du glucose et du lactate.

Tableau inspiré des figures de (Lopaschuk, 2017).



**Figure 12. Voies métaboliques du glucose et des acides gras dans un coeur sain**

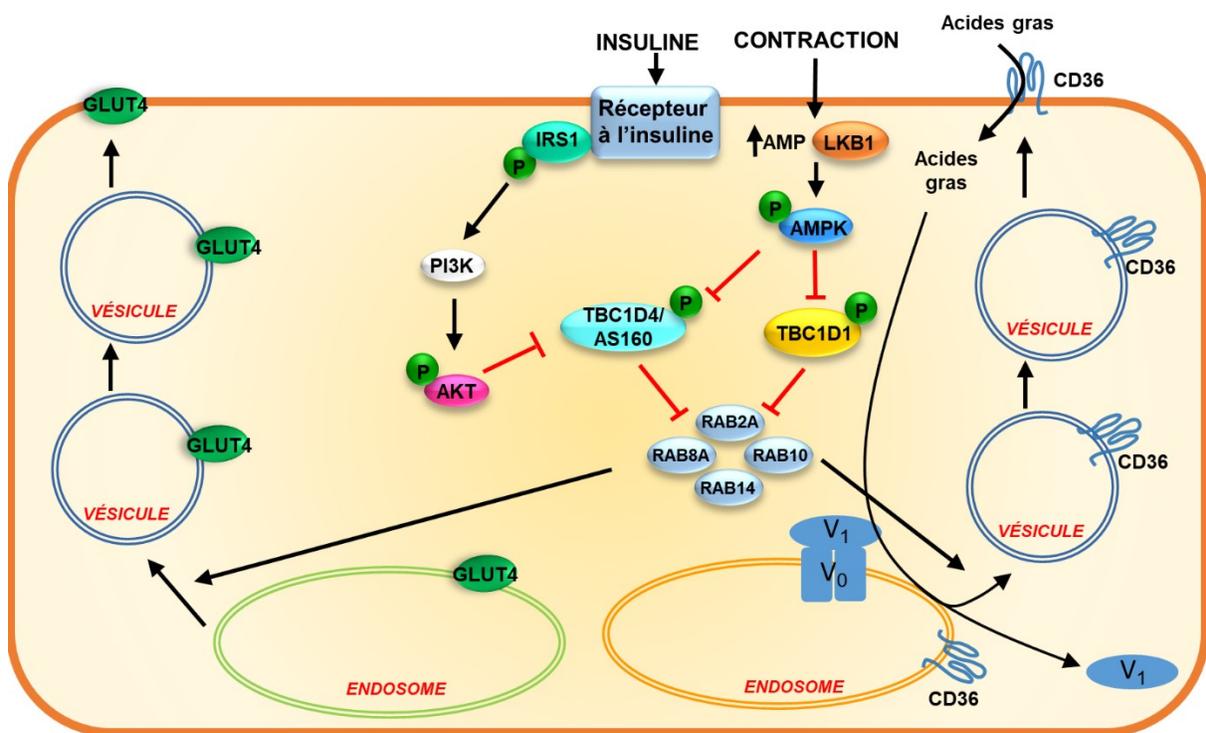
Le métabolisme cardiaque en situation physiologique normale. Les flèches de couleur orange représentent les voies qui favorisent le métabolisme des acides gras en condition physiologique. ACBP, *acyl-CoA binding protein*; ACS, *acyl-CoA synthétase*; AMP, *adénosine monophosphate*; ATP, *adénosine triphosphate*; CAT, *carnitine acyl-carnitine translocase*; CPT1b, *carnitine palmitoyltransférase 1b*; CPT2, *carnitine palmitoyltransférase 2*; FAD, *flavine adénine dinucléotide*;  $FADH_2$ , *flavine adénine dinucléotide réduit*; GLUT, *transporteur du glucose*; LDH, *lactate déshydrogénase*; MPC, *mitochondrial pyruvate carrier*; NAD,

nicotinamide adénine dinucléotide; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduit; PDH, pyruvate déshydrogénase; PFK1, phosphofructokinase-1; VLDL, *very low density lipoprotéine*. Figure inspirée de (Lopaschuk et coll., 2010).

### 1.2.1.1 Les acides gras

Tel que mentionné précédemment, le cœur utilise principalement les acides gras comme substrat énergétique pour produire son ATP. Ces acides gras incluent les acides gras à chaînes longues libérés des triglycérides contenus dans les chylomicrons et les VLDL en circulation sous l'action de la LPL. Ils peuvent également être captés sous forme d'AGNEs liés à l'albumine circulante ou libérés à partir des triglycérides emmagasinés sous forme de gouttelettes lipidiques dans les cardiomyocytes (Lopaschuk et coll., 2010). Les acides gras circulants peuvent traverser la membrane sarcolemmique des cardiomyocytes par diffusion passive, mais ce processus est trop lent pour fournir la quantité d'acides gras nécessaire au bon fonctionnement du cœur. La capture myocardique des acides gras à l'aide de transporteurs est donc privilégiée. Ainsi, les AGNEs pénètrent dans la cellule par transport facilité à l'aide des protéines membranaires FATP-1 et -6, CD36 et FABPpm (Glatz et coll., 2010). Parmi ces protéines, des études d'inhibition (Luiken et coll., 2004) et de délétion (Kuang et coll., 2004) du récepteur CD36 ont montré que celui-ci est responsable de l'internalisation de 50 à 60% des acides gras dans les cardiomyocytes. Une réserve de CD36 se retrouve dans des endosomes et peut être déplacée dans des vésicules vers la membrane sarcolemmique pour augmenter, si nécessaire, l'internalisation des acides gras (Luiken et coll., 2004). Les contractions cardiaques consomment de l'ATP, diminuant ainsi le ratio ATP/AMP, ce qui stimule l'AMPK à phosphoryler et inactiver la TBC1D1 (*TBC1 domain family member 1*). En temps normal, la TBC1D1 hydrolyse le GTP et garde la GTPase Rab sous sa forme inactive couplée à la guanosine diphosphate (GDP). L'inactivation de la TBC1D1 par l'AMPK permet le couplage du GTP avec les protéines Rab (2A, 8A, 10 et 14). Le complexe Rab peut ensuite aller à la membrane des endosomes pour transférer son GTP à un effecteur de Rab, ce qui permet la fusion des endosomes avec les vésicules contenant le CD36 et leur transport vers le sarcolemme, augmentant ainsi l'expression sarcolemmale du CD36 (Chanda et coll., 2016; Schwenk et coll., 2010; Tan et coll., 2012). L'AMPK phosphoryle aussi la TBC1D4, aussi appelé AS160 (substrat

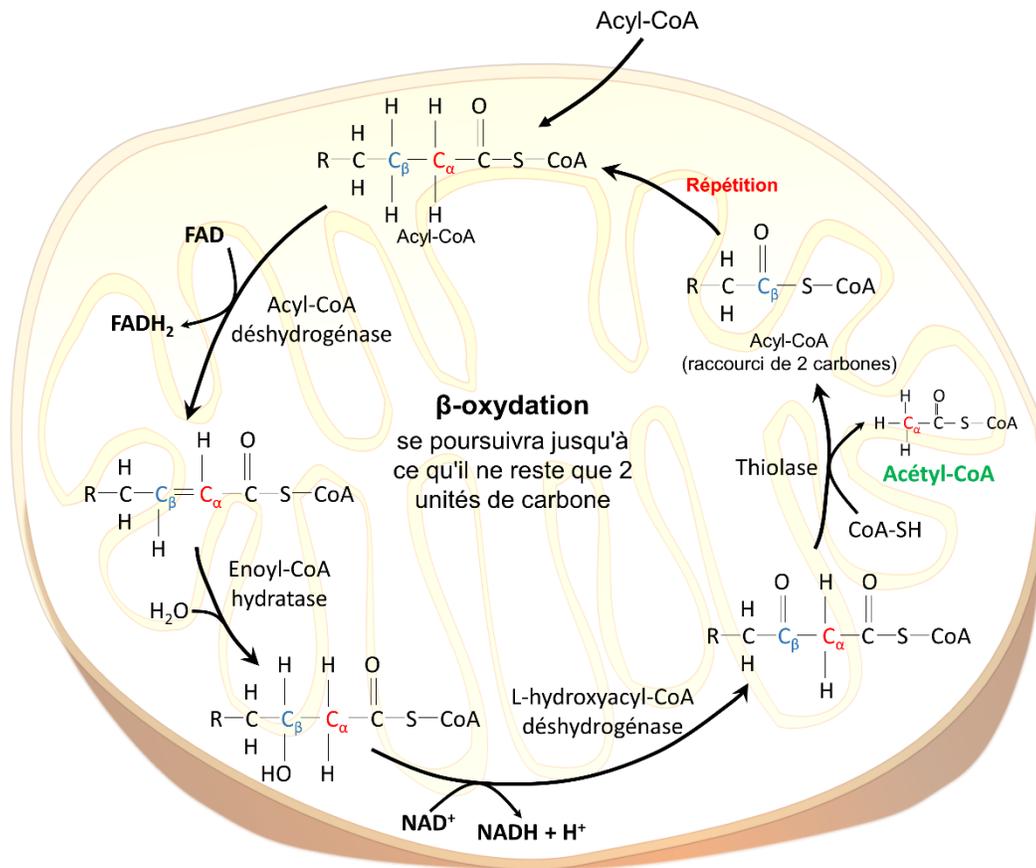
de la protéine kinase B (Akt) 160 kDa), et par les voies de signalisation qui en découlent de manière similaire à la TBC1D1, augmente cette fois la translocation de GLUT4 au sarcolemme (Chanda et coll., 2016). La stimulation de l'AMPK conduit donc à la fois à une augmentation de l'entrée des acides gras et celle du glucose en augmentant l'expression de leurs transporteurs respectifs au sarcolemme. L'entrée des acides gras stimule la LKB1 (*liver kinase B1*) à stimuler davantage l'AMPK, amplifiant ainsi l'entrée des acides gras et du glucose (Samovski et coll., 2015).



**Figure 13. Stimulation de la translocation des vésicules de CD36 et de GLUT4 au sarcolemme par l'AMPK et Akt**

GLUT, transporteur du glucose; IRS, substrat du récepteur de l'insuline; LKB1, *liver kinase B1*; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; TBC1D, *Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family member*; TG, triglycéride; V<sub>0</sub>, canal de protons V<sub>0</sub>; V<sub>1</sub>, ATPase cytosolique V<sub>1</sub>. Figure inspirée et traduite de (Chanda et coll., 2016).

À l'inverse, l'augmentation de la concentration d'acides gras intracellulaires cause la polyubiquitination du CD36, menant à sa dégradation, un mécanisme de rétro-inhibition. Cette ubiquitination est diminuée en présence d'insuline (Lopaschuk et coll., 2010). Une fois dans le cytosol, l'ACS va estérifier les acides gras en y ajoutant un groupement CoA. Les acyl-CoAs ainsi obtenus sont ensuite liés à une protéine de liaison de l'acyl-CoA (ACBP, *acyl-CoA binding protein*) dans le cytosol et peuvent ensuite être emmagasinés sous forme de triglycérides ou être oxydés dans les mitochondries (Figure 14) (Ellis et coll., 2011; Lopaschuk et coll., 2010). Sur la membrane externe mitochondriale, la CPT1b fait entrer les acyl-CoA dans la mitochondrie en transférant le groupement acyl sur la carnitine I pour donner l'acyl-carnitine. L'acyl-carnitine est ensuite transloquée à travers la membrane interne mitochondriale à l'aide de la carnitine acyl-carnitine translocase (CAT), où la CPT2 régénère la carnitine en convertissant l'acyl-carnitine en acyl-CoA afin de pouvoir entrer dans le cycle de la bêta-oxydation. La bêta-oxydation a lieu dans la matrice mitochondriale, où les enzymes acyl-CoA déshydrogénase, énoyl-CoA hydratase, 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et 3-kétoacyl-CoA thiolase vont séquentiellement raccourcir les AGCL de deux carbones pour donner une molécule d'acétyl-CoA, un nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) réduit (NADH) et une flavine adénine dinucléotide (FAD) réduite (FADH<sub>2</sub>) à chaque cycle (Figure 14). Les enzymes acyl-CoA déshydrogénase et 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase sont activées lorsque les ratios FADH<sub>2</sub>/FAD et NADH/NAD<sup>+</sup> sont diminués, tandis que la 3-kétoacyl-CoA thiolase est inhibée lorsque le ratio acétyl-CoA/CoA est augmenté. Cela permet de diminuer l'activité de la bêta-oxydation lorsque l'activité du cycle de Krebs et de la chaîne de transport des électrons (CTE) sont diminuées dans une situation de faible demande métabolique (Jaswal et coll., 2011).



**Figure 14. La bêta-oxydation des acides gras**

NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduit; FAD, flavine adénine dinucléotide; FADH<sub>2</sub>, flavine adénine dinucléotide réduite. Figure inspirée et traduite de (Lopaschuk et coll., 2010).

Des études ont suggéré que la CPT1b est l'enzyme limitante pour le métabolisme global des acides gras (Saddik et coll., 1993), mais la diminution de son activité de 44% par l'étomoxir n'a toutefois pas altéré la vitesse d'internalisation et d'oxydation des acides gras dans le myocarde (Luiken et coll., 2009). Il serait donc plus probable que la vitesse d'internalisation des acides gras soit régulée principalement par les protéines membranaires, telles que le CD36 (Glatz et coll., 2016), tandis que la CPT1b soit l'enzyme responsable de l'étape limitante de la bêta-oxydation, puisqu'elle contrôle l'entrée des acides gras dans la mitochondrie (Onay-Besikci et coll., 2003). L'activité de la CPT1b est régulée par rétro-inhibition. L'acétyl-CoA mitochondrial peut être converti en acétylcarnitine par la carnitine acétyltransférase et transporté

vers le cytosol, puis reconverti en acétyl-CoA par la carnitine acétyltransférase cytosolique (Reszko et coll., 2004). Lorsque les concentrations d'acétyl-CoA cytosoliques sont élevées, l'ACC2 (*acetyl-CoA carboxylase-2*) catalyse la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, qui peut lier la CPT1b et inhiber ainsi son activité. Par contre, lorsque les niveaux cytosoliques de malonyl-CoA sont élevés, la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) convertit le malonyl-CoA en acétyl-CoA, levant son effet inhibiteur sur la CPT1b (Saddik et coll., 1993). De plus, une quantité de citrate peut s'échapper lors de son oxydation dans le cycle de Krebs, à l'étape d'oxydation de l'acétyl-CoA, et peut être déplacé vers le cytosol par le transporteur tricarboxylate, activer l'ACC2 de manière allostérique et diminuer ainsi l'entrée d'acides gras dans la mitochondrie (Munday, 2002). D'autre part, l'activité de l'ACC2 est diminuée après sa phosphorylation par l'AMPK (Hardie, 1992).

### 1.2.1.2 Le glucose

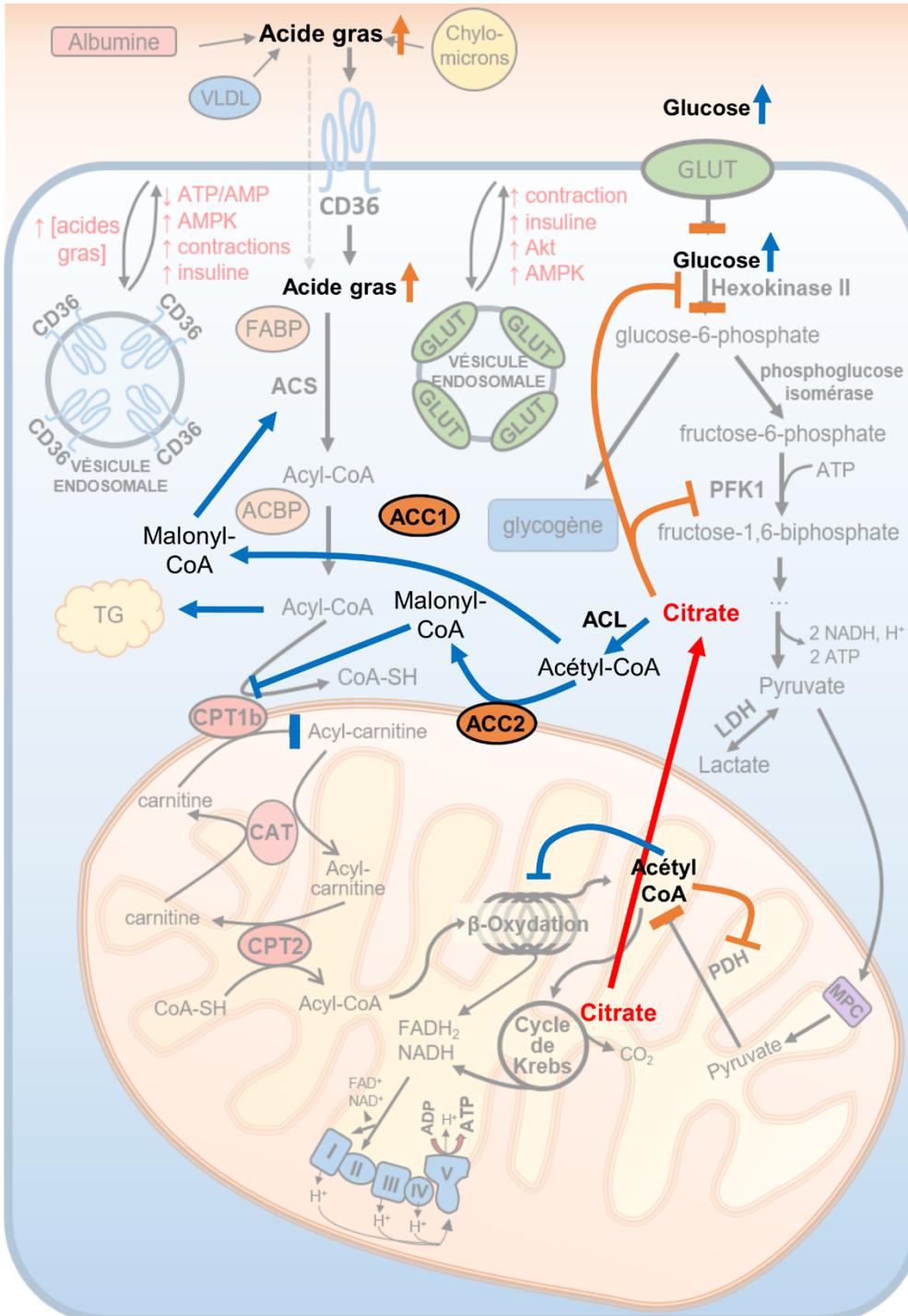
L'entrée du glucose dans les cardiomyocytes est régulée par sa translocation à travers les transporteurs de glucose, GLUT1 et GLUT4, par diffusion facilitée indépendamment de l'ATP au niveau de la membrane sarcolemmique (Becker et coll., 2001; Hruz et Mueckler, 2001). Comme pour le CD36, on retrouve une réserve de GLUT4 dans des endosomes, cette dernière pouvant être déplacée au sarcolemme lorsque le cœur requiert plus d'énergie. Ce mouvement du GLUT4 est stimulé par les contractions et l'insuline par les mêmes voies que celles utilisées pour le déplacement des réserves de CD36, comme expliqué précédemment (figure 13) (Luiken et coll., 2004; Luiken et coll., 2015; Steinbusch et coll., 2011). Une fois à l'intérieur de la cellule, le glucose y est séquestré après sa phosphorylation par l'hexokinase II en glucose-6-phosphate (Postic et coll., 1994). À cette étape, le glucose peut être emmagasiné sous forme de glycogène ou entrer dans la voie de la glycolyse. Si le glucose est destiné à la glycolyse, le glucose-6-phosphate est transformé en fructose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase, puis la phosphofructokinase-1 (PFK1) le convertit en fructose-1,6-biphosphate, une étape qui consomme une molécule d'ATP. L'activité de la PFK1 est augmentée en présence de fructose-6-phosphate, alors qu'elle est inhibée lorsque les taux d'ATP, de citrate ou de protons augmentent (Depre et coll., 1998). À la fin de la glycolyse, la molécule de glucose a été convertie en deux molécules de pyruvate avec la production de deux

molécules d'ATP et de deux coenzymes  $\text{NAD}^+$  réduits en  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Le pyruvate peut, par la suite, soit entrer dans la voie de l'oxydation du glucose, soit être converti en lactate. Il est à noter qu'en condition ischémique (section 1.2.3.1), en absence d'oxygène ( $\text{O}_2$ ), le pyruvate est converti en lactate par le lactate déshydrogénase, une réaction couplée à l'oxydation du  $\text{NADH}$  en  $\text{NAD}^+$ , permettant ainsi de maintenir la glycolyse active (Jaswal et coll., 2011). En présence d'oxygène, la voie de l'oxydation du glucose (ou oxydation du pyruvate) est favorisée et le pyruvate entre dans la mitochondrie par le transporteur de pyruvate mitochondrial (MPC, *mitochondrial pyruvate carrier*) en même temps qu'un proton pour préserver une charge électrostatique neutre. Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate est converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) (figure 12), une enzyme faisant partie d'un complexe composé de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) et de la pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDP). La PDH régule l'oxydation du glucose et elle est elle-même régulée par sa phosphorylation et par les concentrations de ses produits et de ses substrats (Holness et Sugden, 2003; Sugden et Holness, 2003). Lorsque les niveaux d'acétyl-CoA/CoA et de  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  augmentent, la PDK devient active et phosphoryle la PDH, ce qui l'inactive. Par contre, la PDH et la PDP deviennent plus actives en présence de grande quantité de pyruvate ou de calcium, respectivement, dans la mitochondrie ce qui conduit à la déphosphorylation et à l'activation de la PDH (Holness et Sugden, 2003; Sugden et Holness, 2003).

### 1.2.1.3 Le cycle de Randle

Il a été mentionné précédemment que le cœur utilise principalement les acides gras comme source d'énergie en condition physiologique normale. Toutefois, le cœur est un organe qui possède la capacité de changer rapidement de substrat selon leur disponibilité afin de continuer à produire de l'ATP pour son bon fonctionnement (Hue et Taegtmeyer, 2009). Les métabolismes des acides gras et du glucose se régulent l'un et l'autre à travers le cycle de Randle, nommé ainsi par celui qui l'a décrit en 1963 (Randle et coll., 1963). L'acétyl-CoA et le  $\text{NADH}$  produits par l'oxydation des acides gras peuvent inhiber la PDH, inhibant ainsi l'oxydation du glucose (Jaswal et coll., 2011). De plus, le citrate, retrouvé dans le cycle de Krebs, peut aller dans le cytosol et inhiber la PFK1, causant une accumulation de glucose-6-phosphate, qui à son tour inhibe l'hexokinase II (Randle, 1998).

D'un autre côté, l'acétyl-CoA produit par la PDH inhibe l'enzyme 3-kétoacyl-CoA thiolase, alors que le NADH produit par l'oxydation du glucose inhibe les enzymes 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et l'acyl-CoA déshydrogénase dans le cycle de la bêta-oxydation (Jaswal et coll., 2011). Une augmentation de la production d'acétyl-CoA peut aussi inhiber l'oxydation des acides gras après sa conversion en malonyl-CoA par l'ACC2 mitochondriale, qui inhibe la CPT1 et ainsi empêche l'entrée des acides gras dans la mitochondrie, alors que la conversion en malonyl-CoA par l'ACC1 cytosolique favorise l'emmagasinage des acides gras sous forme de triglycérides (figure 15) (Stanley et coll., 2005). L'inhibition de l'oxydation du glucose en présence d'un haut taux d'oxydation des acides gras mène à son découplage avec la glycolyse, ce qui peut conduire à une forte production de lactate et de protons. L'absence du co-transporteur des protons avec le pyruvate dans les mitochondries cause leur accumulation dans le cytosol. Par conséquent, le pH intracellulaire chute et l'élimination des protons dans le milieu extracellulaire résultera en une accumulation de sodium et de calcium et de la consommation d'ATP par les différents échangeurs ioniques (Lopaschuk et coll., 2010). Ces événements seront détaillés dans la section sur l'ischémie du myocarde.



**Figure 15. Le cycle de Randle**

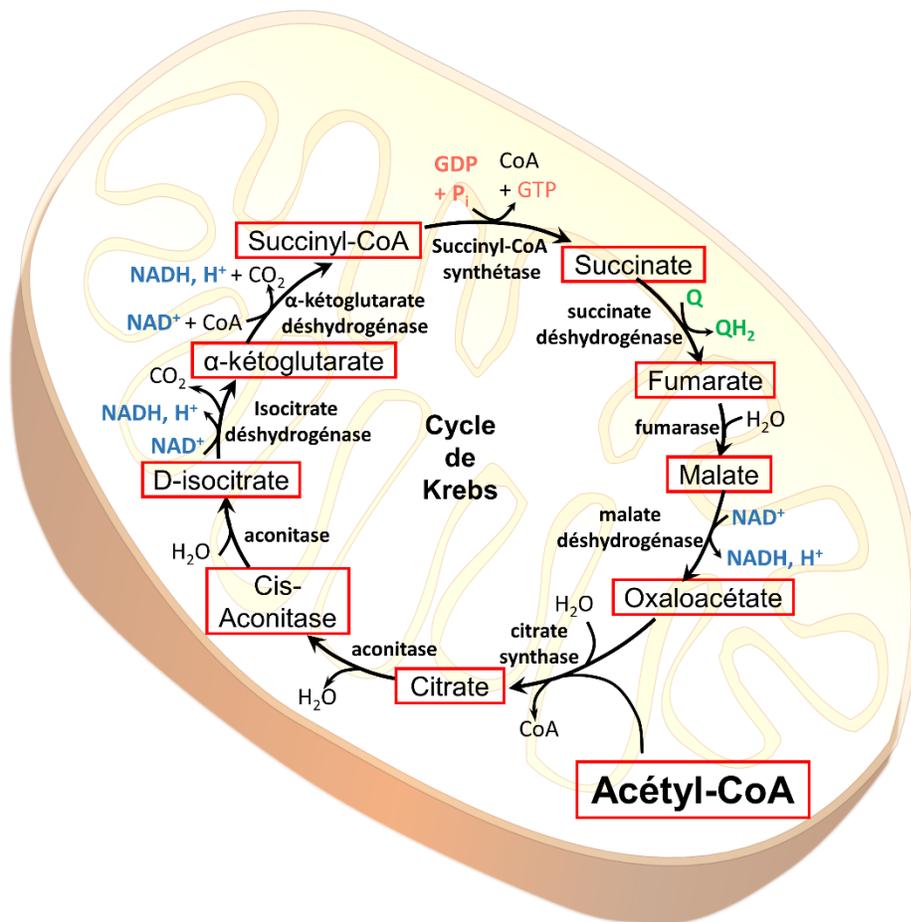
Voies métaboliques du glucose et des acides gras dans le cœur qui s'opposent l'un contre l'autre pour promouvoir le métabolisme de son substrat respectif. Le métabolisme cardiaque en situation physiologique normale a été mis plus pâle pour mettre en évidence les éléments

pertinents au cycle de Randle sur l'inhibition des voies métaboliques des acides gras et du glucose illustrés en gras. La couleur orange représente les voies qui favorisent le métabolisme des acides gras et la couleur bleue représente les voies qui favorisent le métabolisme du glucose. ACBP, *acyl-CoA binding protein*; ACC, acétyl-CoA carboxylase; ACL, *ATP citrate lyase*; ACS, acyl-CoA synthétase; AMP, adénosine monophosphate; AMPK, protéine kinase activée par l'AMP; ATP, adénosine triphosphate; CAT, carnitine acyl-carnitine translocase; CPT1b, carnitine palmitoyltransférase 1b; CPT2, carnitine palmitoyltransférase 2; FABP, *fatty acid binding protein*; FAD, flavine adénine dinucléotide; FADH<sub>2</sub>, flavine adénine dinucléotide réduite; GLUT, transporteur du glucose; LDH, lactate déshydrogénase; MPC, *mitochondrial pyruvate carrier*; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduit; O<sub>2</sub>, oxygène; PDH, pyruvate déshydrogénase; PFK1, phosphofructokinase-1; VLDL, *very low density lipoprotein*. Figure inspirée de (Lopaschuk et coll., 2010).

#### 1.2.1.4 Le cycle de Krebs

L'acétyl-CoA produit par la bêta-oxydation et l'oxydation du glucose entre ensuite dans le cycle de Krebs, aussi appelé le cycle de l'acide citrique, en honneur du nom de la personne qui l'a décrite en 1937 (Burdette, 1952). L'acétyl-CoA est d'abord condensé avec l'oxaloacétate par la citrate synthase pour former le citrate et conduire à la libération du groupement CoA. Le citrate peut sortir de la mitochondrie ou être déshydraté par l'aconitase pour former le cis-citrate qui est ensuite réhydraté par l'aconitase pour former l'isocitrate. L'isocitrate est ensuite oxydé et décarboxylé par l'isocitrate déshydrogénase pour former l' $\alpha$ -kétoglutarate, produisant une molécule de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et de NADH par la réduction du NAD<sup>+</sup>. L' $\alpha$ -kétoglutarate est oxydé et décarboxylé par l' $\alpha$ -kétoglutarate déshydrogénase pour former le succinyl-CoA, une réaction qui transfère le groupement CoA et qui produit encore une fois une molécule de CO<sub>2</sub> et de NADH. Le succinyl-CoA est ensuite déphosphorylé par la succinyl-CoA synthétase pour former le succinate, une réaction qui libère le groupement CoA et qui produit une molécule de GTP ou d'ATP. Le succinate est ensuite oxydé par la succinate déshydrogénase pour former le fumarate et une molécule de FADH<sub>2</sub> après la réduction du FAD<sup>+</sup>. Par la suite, le fumarate est hydraté par la fumarase pour former le malate, qui sera oxydé par la malate déshydrogénase pour finalement régénérer l'oxaloacétate en produisant aussi un NADH (figure

16) (Cardaci et Ciriolo, 2012). Il est à noter que le pyruvate peut aussi être carboxylé par la pyruvate carboxylase pour former l'oxaloacétate, une réaction qui requiert un ATP. Cela permet d'augmenter la quantité de substrat enzymatique et la fréquence des réactions du cycle de l'acide citrique. Cet effet anaplérotique permet à la mitochondrie de produire plus d'ATP dans des situations où la demande énergétique cellulaire est plus élevée (Davis et coll., 1980).



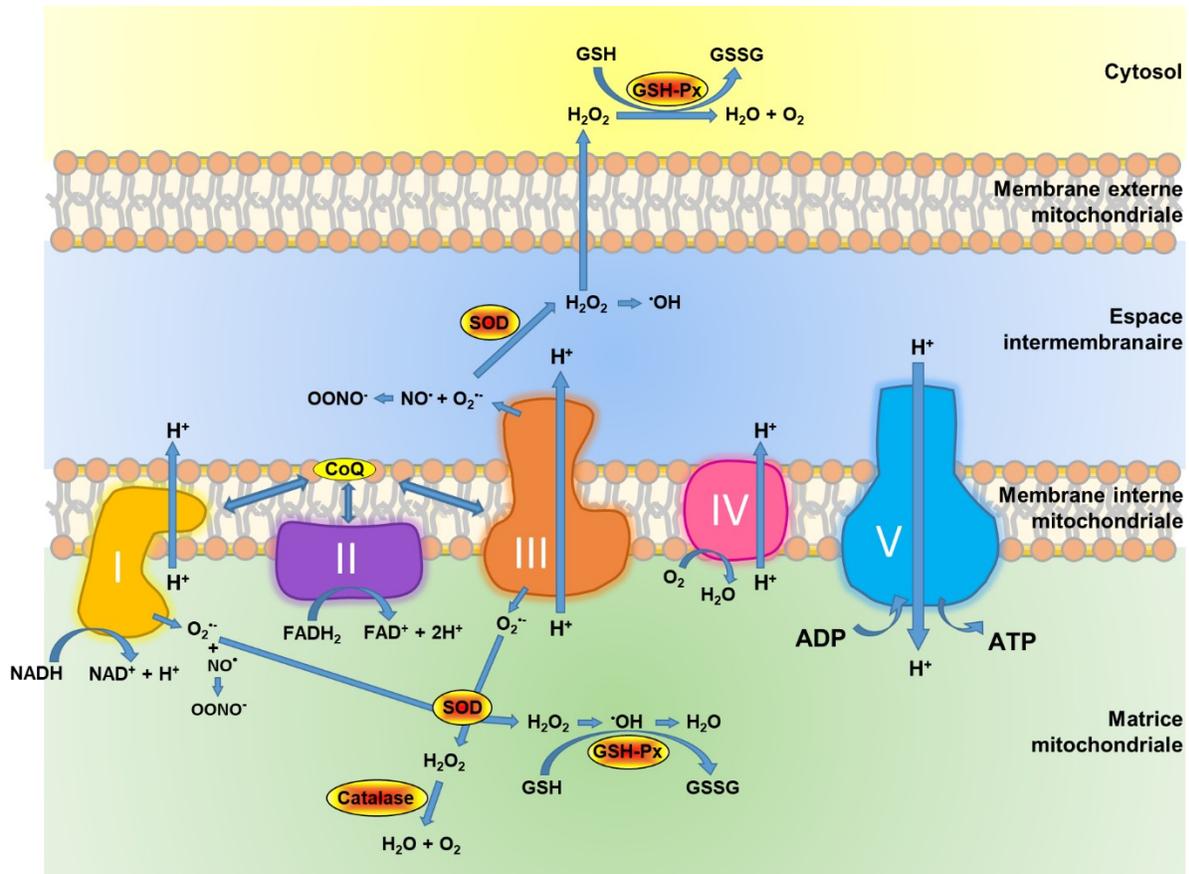
**Figure 16. Le cycle de Krebs**

GDP, guanidine diphosphate; GTP, guanidine triphosphate; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; NADH nicotinamide adénine dinucléotide réduite; Q, ubiquinone; QH<sub>2</sub>, ubiquinone réduite. Figure inspirée de (Larhlimi et coll., 2012; Tretter et Adam-Vizi, 2005).

### 1.2.1.5 La phosphorylation oxydative

Les NADH et FADH<sub>2</sub> produits par la bêta-oxydation et le cycle de Krebs entrent ensuite dans la CTE mitochondriale où a lieu la phosphorylation oxydative. Pendant la phosphorylation oxydative, les électrons des co-facteurs NADH et FADH<sub>2</sub> sont transférés par les différents complexes de la CTE d'un plus haut potentiel énergétique à un plus faible potentiel énergétique. Au niveau de la NADH déshydrogénase (complexe I), un NADH sera oxydé en NAD<sup>+</sup> + H<sup>+</sup> et libérera deux électrons, générant l'énergie nécessaire au niveau du complexe I pour pomper quatre H<sup>+</sup> de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondriale, créant un fort gradient de protons dans l'espace intermembranaire. Les deux électrons ayant été libérés sont par la suite transférés sur une ubiquinone (co-enzyme Q) qui sera réduite en ubiquinol (QH<sub>2</sub>) contribuant aussi à la génération du gradient puisque les deux H<sup>+</sup> sont issus de la matrice mitochondriale. Au niveau de la succinate déshydrogénase (complexe II), l'oxydation du succinate en fumarate entraîne la réduction du FAD<sup>+</sup> en FADH<sub>2</sub>, puis de la réduction du co-enzyme Q en QH<sub>2</sub> par l'oxydation du FADH<sub>2</sub>, sans contribuer au gradient de protons. Le FADH<sub>2</sub> produit pendant la bêta-oxydation et le cycle de Krebs peut aussi transférer deux électrons à la co-enzyme Q. Au niveau du cytochrome c réductase (complexe III), les deux QH<sub>2</sub> vont réduire le cytochrome c qui ne peut accepter qu'un seul électron, permettant de pomper quatre autres H<sup>+</sup> de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondriale. Au niveau de la cytochrome c réductase (complexe IV), les quatre cytochromes c réduits du complexe III vont transférer leurs électrons, ce qui permettra à quatre H<sup>+</sup> d'être pompés vers l'espace intermembranaire mitochondriale. L'O<sub>2</sub> est le dernier accepteur d'électrons et sera réduit en eau (H<sub>2</sub>O). Le fort gradient de protons obtenu par le pompage des H<sup>+</sup> dans l'espace intermembranaire traverse l'ATP synthase (complexe V) pour rentrer de nouveau dans la matrice mitochondriale, générant l'énergie nécessaire pour la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP (figure 17) (Hatefi, 1985; Saraste, 1999; Sousa et coll., 2018). Quatre protons sont nécessaires pour produire une molécule d'ATP et chaque molécule de NADH et de FADH<sub>2</sub> produisent 2,5 ATP et 1,5 ATP, respectivement, et consomment une molécule d'O<sub>2</sub>. Au final, l'oxydation d'une molécule de glucose produit 32 ATP et consomme 12 molécules d'O<sub>2</sub>, en comparaison à une molécule de palmitate, un acide gras à 16 carbones, qui produit 105 molécules d'ATP mais qui consomme 46 molécules d'O<sub>2</sub> (Lopaschuk et coll., 2010).

En condition normale, 99% de l'oxygène qui entre dans la cellule est réduit en H<sub>2</sub>O par le complexe IV de la CTE. Le 1% d'oxygène restant est réduit prématurément, au niveau de la CTE, en radicaux libres, dont l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), principalement dû à un découplage d'électrons sur les complexes I et III de la CTE (Brand, 2010; St-Pierre et coll., 2002). Le complexe I ne libère de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> que dans la matrice, tandis que le complexe III libère de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> à la fois dans la matrice et dans l'espace intermembranaire mitochondriale (Muller et coll., 2004). Toutefois, cette quantité d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> générée est amplement tolérable par la cellule et sera métabolisée en H<sub>2</sub>O par les enzymes anti-oxydantes telles que la catalase, la SOD et la glutathione peroxydase (GSH-Px) (figure 17) (Dorweiler et coll., 2007). Il est estimé qu'en condition normale, 90% de la production de ROS intracellulaire provient de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie (Kanaan et Harper, 2017).



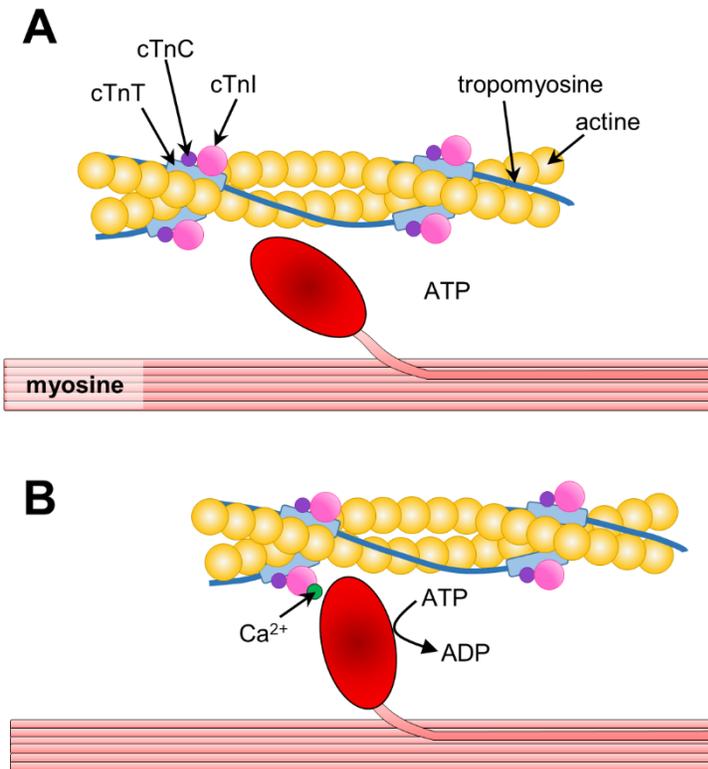
**Figure 17. Production des espèces réactives de l'oxygène pendant la phosphorylation oxydative et le système d'anti-oxydants cellulaires**

FAD, flavine adénine dinucléotide; FADH<sub>2</sub>, flavine adénine dinucléotide réduite; GSH-Px, glutathione peroxydase; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduite; SOD, superoxyde dismutase. Figure modifiée et traduite de (Reiter et coll., 2018).

## 1.2.2 Contraction cardiomusculaire

Les molécules d'ATP générées par la cellule servent principalement à la contraction du muscle cardiaque, une action bien régulée. La contraction musculaire s'effectue grâce aux filaments d'actine et de myosine. Le filament d'actine possède des sites de liaison pour la myosine qui sont toutefois cachés par la tropomyosine. On retrouve un complexe de troponine (cTnI, T et C) sur la tropomyosine qui régule la liaison de la myosine avec l'actine. La cTnT lie

le complexe de troponine à la tropomyosine. La cTnI inhibe l'activité ATPase de la myosine et empêche la liaison de la myosine à l'actine. La cTnC, quant à elle, peut lier le calcium et créer un changement de conformation du complexe de troponine, levant l'effet inhibiteur de la cTnI et permettant à la tropomyosine de faire une rotation sur le filament d'actine, ce qui libère le site de fixation de la myosine à l'actine. La tête de la myosine peut alors lier l'ATP et l'hydrolyser, libérant l'énergie nécessaire à la myosine pour changer de position en état activé, puis lier l'actine (figure 18). La libération de l'ADP force la myosine à se contracter et à tirer sur le filament d'actine, ce qui fait glisser les filaments d'actine sur les filaments de myosine et initie alors la contraction musculaire (Adamcova et coll., 2016). Parmi les troponines du complexe, la cTnI est la plus spécifique au tissu cardiaque, puisqu'on peut retrouver une très faible quantité de cTnT dans les muscles squelettiques (Ricchiuti et coll., 1998). La cTnC, par contre, n'est pas spécifique au cœur car on peut aussi la retrouver en abondance dans les muscles squelettiques et les muscles lisses (Fathil et coll., 2015). Dans les pathologies du myocarde, telles que l'I/RM, la mort des cardiomyocytes cause la relâche de plusieurs biomarqueurs, tels que la créatine kinase (CK), le lactate déshydrogénase (LDH) et les troponines. La cTnT et la cTnI sont considérées comme les biomarqueurs cardiaques les plus sensibles et spécifiques (Jaffe et Ordonez-Llanos, 2010).



**Figure 18. Contraction des fibres musculaires cardiaques**

cTnC, troponine C cardiaque; cTnI, troponine I cardiaque; cTnT, troponine T cardiaque. Figure inspirée de (Hamdani et coll., 2008).

### 1.2.3 Ischémie/reperfusion du myocarde

L'infarctus du myocarde demeure encore l'une des principales causes de mortalité dans le monde (Wang et coll., 2016). Selon Statistique Canada, les maladies du cœur se classent comme 2<sup>e</sup> rang, suite au cancer, comme principales causes de décès au Canada, dont plus 50 000 en ont été comptés en 2016. On estime qu'à toutes les 40 secondes, une personne américaine sera sujette à un IAM ; chaque année, il y a 580 000 nouveaux cas de crise cardiaque et 210 000 cas récurrents. La cardiopathie ischémique représente plus de la moitié des incidents cardiovasculaires (Benjamin et coll., 2017). Des interventions, telles que le pontage aorto-coronarien, l'angioplastie percutanée et la fibrinolyse, sont pratiquées et permettent de rapidement rétablir le flux sanguin dans une région du cœur en ischémie (Ibanez et coll., 2018;

Tran et coll., 2017). Toutefois, le développement de nouvelles thérapies est encore nécessaire pour diminuer davantage les dommages et la dysfonction cardiaque après une I/RM.

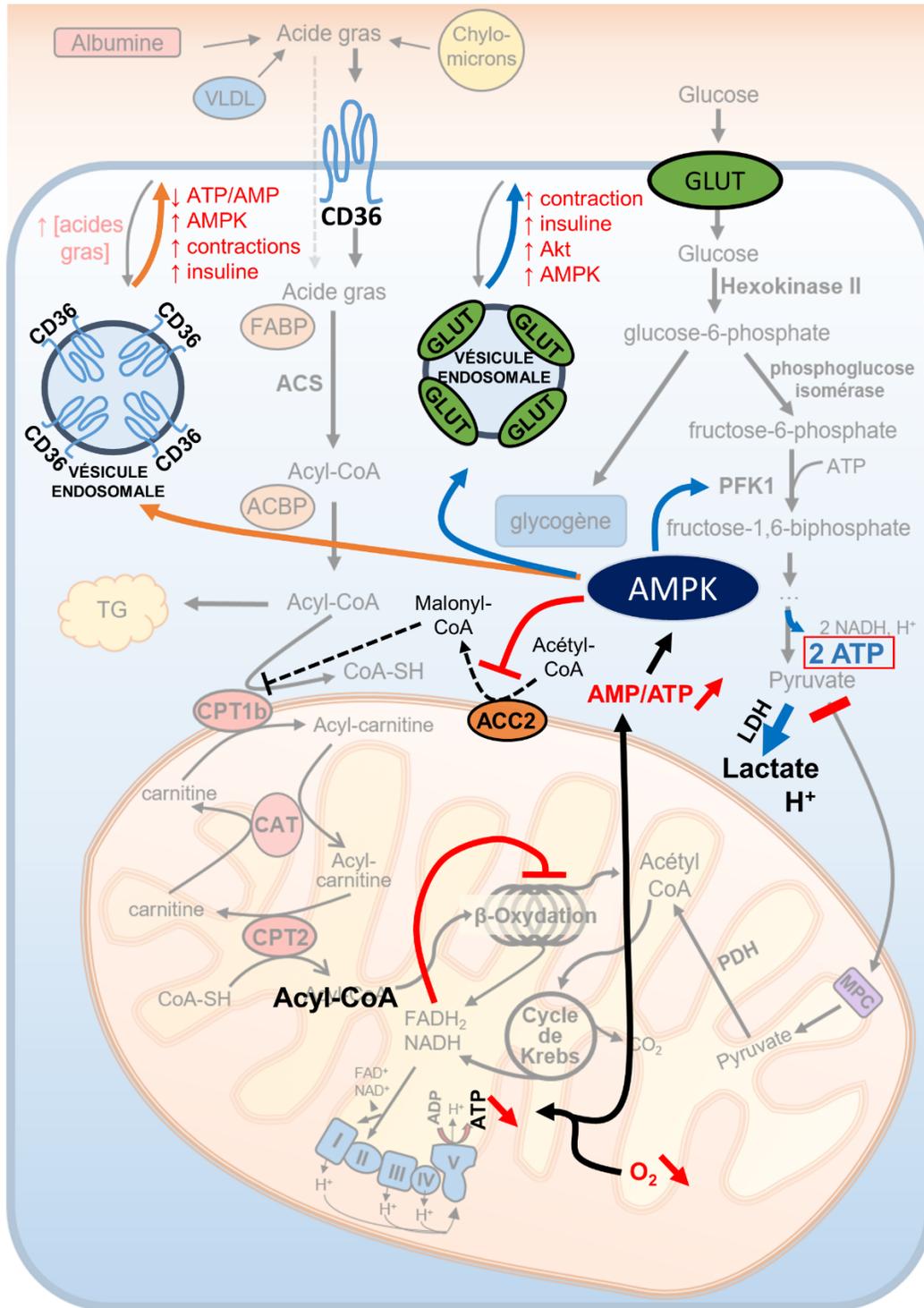
### **1.2.3.1 Ischémie du myocarde**

Dans la majorité des cas, l'IAM survient suite à la rupture d'une plaque athérosclérotique (voir section 1.1.7.2 pour les détails sur le développement de l'athérosclérose) dans une artère coronaire qui sera bloquée suite à la formation d'un caillot sanguin. (Thygesen et coll., 2012). Dans des cas plus rares, des vasospasmes au niveau des artères coronaires peuvent temporairement bloquer le flux sanguin, conduisant à un IAM (Ertan et coll., 2017).

#### **1.2.3.1.1 Métabolisme d'un cœur en ischémie**

Pendant l'ischémie, l'occlusion de l'artère coronaire interrompt le flux sanguin et, de manière concomitante, l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules, mais aussi l'élimination des déchets produits dans la zone touchée par l'ischémie. L'absence d'apport en nutriments et en oxygène provoque une diminution du ratio d'ATP/AMP intracellulaire, ce qui active l'AMPK. L'AMPK activée vient inactiver l'ACC2, diminuant ainsi la production de malonyl-CoA et levant son effet inhibiteur sur l'entrée des acyl-CoA à chaînes longues dans la mitochondrie. On observe donc une augmentation de l'oxydation des acides gras (Kudo et coll., 1995). De plus, la déplétion éventuelle d'oxygène freine la phosphorylation oxydative, qui est responsable de la majeure partie de la production d'ATP, et conduit donc à un épuisement d'énergie (figure 19) (Altamirano et coll., 2015). L'accumulation de NADH et de FADH<sub>2</sub> dans la mitochondrie inhibe les enzymes acyl-CoA déshydrogénase et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de la bêta-oxydation (Jaswal et coll., 2011). Les acyl-carnitines commencent alors à s'accumuler dans la mitochondrie et le cytosol, et les acyl-CoA à chaînes longues s'accumulent dans la mitochondrie. Après une accumulation trop importante, les propriétés détergentes des acyl-CoA à chaînes longues vont éventuellement causer des dommages à la morphologie et aux fonctions des mitochondries (Lopaschuk et coll., 2010). Afin de continuer à produire de l'ATP, les cellules se tournent vers la glycolyse anaérobie par la fermentation du pyruvate en acide lactique permettant ainsi de régénérer le co-facteur NAD<sup>+</sup>. Toutefois,

l'accumulation d'acide lactique et de protons dans la cellule, combinée à l'incapacité d'éliminer le CO<sub>2</sub> dans l'espace extracellulaire, cause une acidification du cytosol à un pH de 6,4 en moins de 20 minutes (Inserte et coll., 2009).



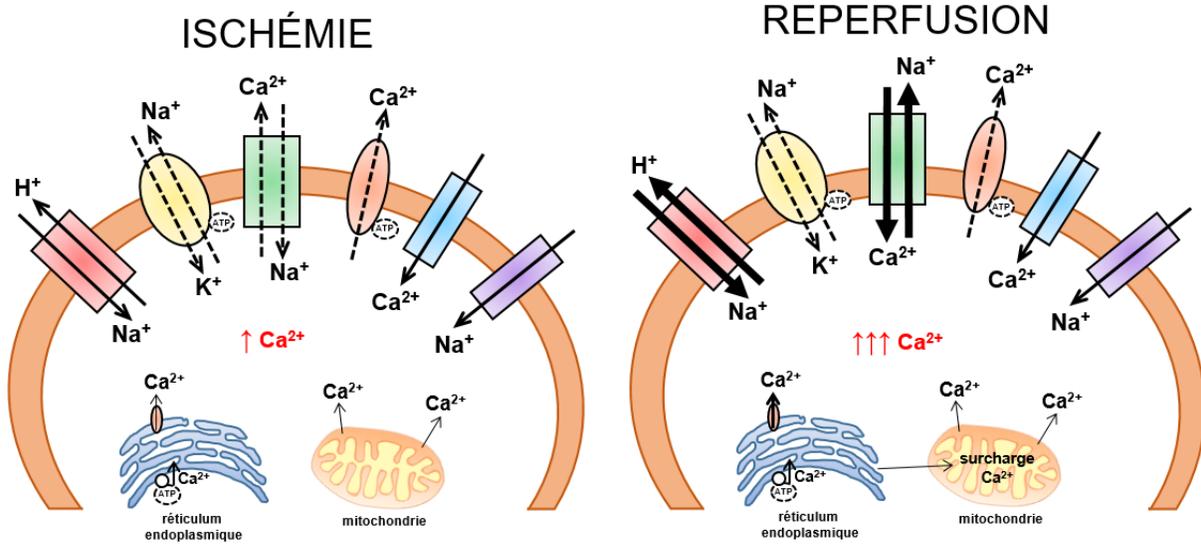
**Figure 19. Voies métaboliques du glucose et des acides gras dans un coeur en ischémie**

Seuls les changements métaboliques lors de l'ischémie ont été mis en évidence. La couleur orange représente les voies qui favorisent le métabolisme des acides gras et la couleur bleue représente les voies qui favorisent le métabolisme du glucose. ACBP, *acyl-CoA binding protein*;

ACC, acétyl-CoA carboxylase; ACS, acyl-CoA synthétase; AMP, adénosine monophosphate; AMPK, protéine kinase activée par l'AMP; ATP, adénosine triphosphate; CAT, carnitine acyl-carnitine translocase; CPT1b, carnitine palmitoyltransférase 1b; CPT2, carnitine palmitoyltransférase 2; FABP, *fatty acid binding protein*; FAD, flavine adénine dinucléotide; FADH<sub>2</sub>, flavine adénine dinucléotide réduite; GLUT, transporteur du glucose; LDH, lactate déshydrogénase; MPC, *mitochondrial pyruvate carrier*; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduit; O<sub>2</sub>, oxygène; PDH, pyruvate déshydrogénase; PFK1, phosphofructokinase-1; VLDL, *very low density lipoprotein*. Figure inspirée de (Lopaschuk et coll., 2010).

### 1.2.3.1.2 Les perturbations ioniques

Les cellules réagissent alors en faisant sortir les protons H<sup>+</sup> en échange d'une entrée de Na<sup>+</sup> à travers l'échangeur Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> (NHE) selon le gradient ionique. L'échangeur Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> (NCX) ne peut pas faire sortir le calcium parce que le gradient de sodium est trop élevé dans la cellule, ce qui résulte en une surcharge en calcium intracellulaire (Chen et Li, 2012). Les mitochondries internaliseront initialement l'excès de calcium cytosolique, mais elles seront rapidement dépolarisées et arrêteront aussitôt (Ruiz-Meana et coll., 2006). De manière parallèle, la déplétion d'ATP cause une inhibition de l'activité des enzymes SERCA2a (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a*) et Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase. Cela conduira à une accumulation de calcium et de sodium intracellulaire (figure 20) (Murphy et Steenbergen, 2008). La concentration élevée de sodium intracellulaire provoque une entrée d'eau et un gonflement de la cellule. D'un autre côté, la forte concentration de calcium dans le cytosol peut stimuler les calpaïnes à initier la protéolyse du cytosquelette (Zhang et coll., 2006), et les myofilaments à se contracter de manière excessive (Garcia-Dorado et coll., 1992) et peut activer les voies de signalisation qui mènent à l'apoptose et possiblement à la nécrose cellulaire.

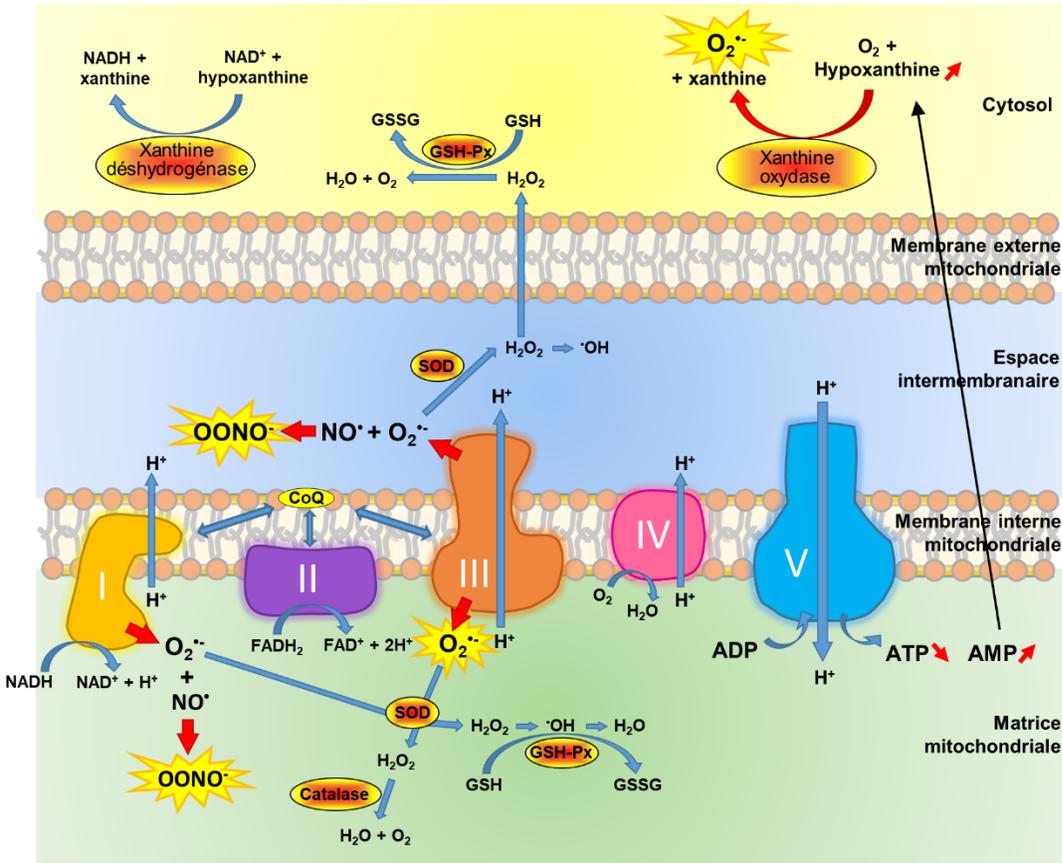


**Figure 20. Perturbation des ions dans les cardiomyocytes en conditions d'ischémie et de reperfusion**

Figure modifiée et traduite de (Kalogeris et coll., 2012).

### 1.2.3.1.3 Le stress oxydatif

L'épuisement de l'ATP conduit à sa dégradation en ADP, AMP, puis en adénosine et finalement en hypoxanthine. L'hypoxanthine est normalement convertie en xanthine par la xanthine déshydrogénase. Toutefois, l'ischémie cause un changement de conformation de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase qui génère des ROS (Chambers et coll., 1985). Au niveau de la CTE mitochondriale, les complexes I et III demeurent dans un état réduit et augmentent la production de  $O_2^-$  à un tel point que le système anti-oxydant de la cellule devient dépassé (figure 21) (Solaini et Harris, 2005).



**Figure 21. Génération des ROS en réponse à l'ischémie du myocarde**

FAD, flavine adénine dinucléotide; FADH<sub>2</sub>, flavine adénine dinucléotide réduite; GSH-Px, glutathione peroxydase; SOD, superoxyde dismutase. Figure modifiée et traduite de (Reiter et coll., 2018).

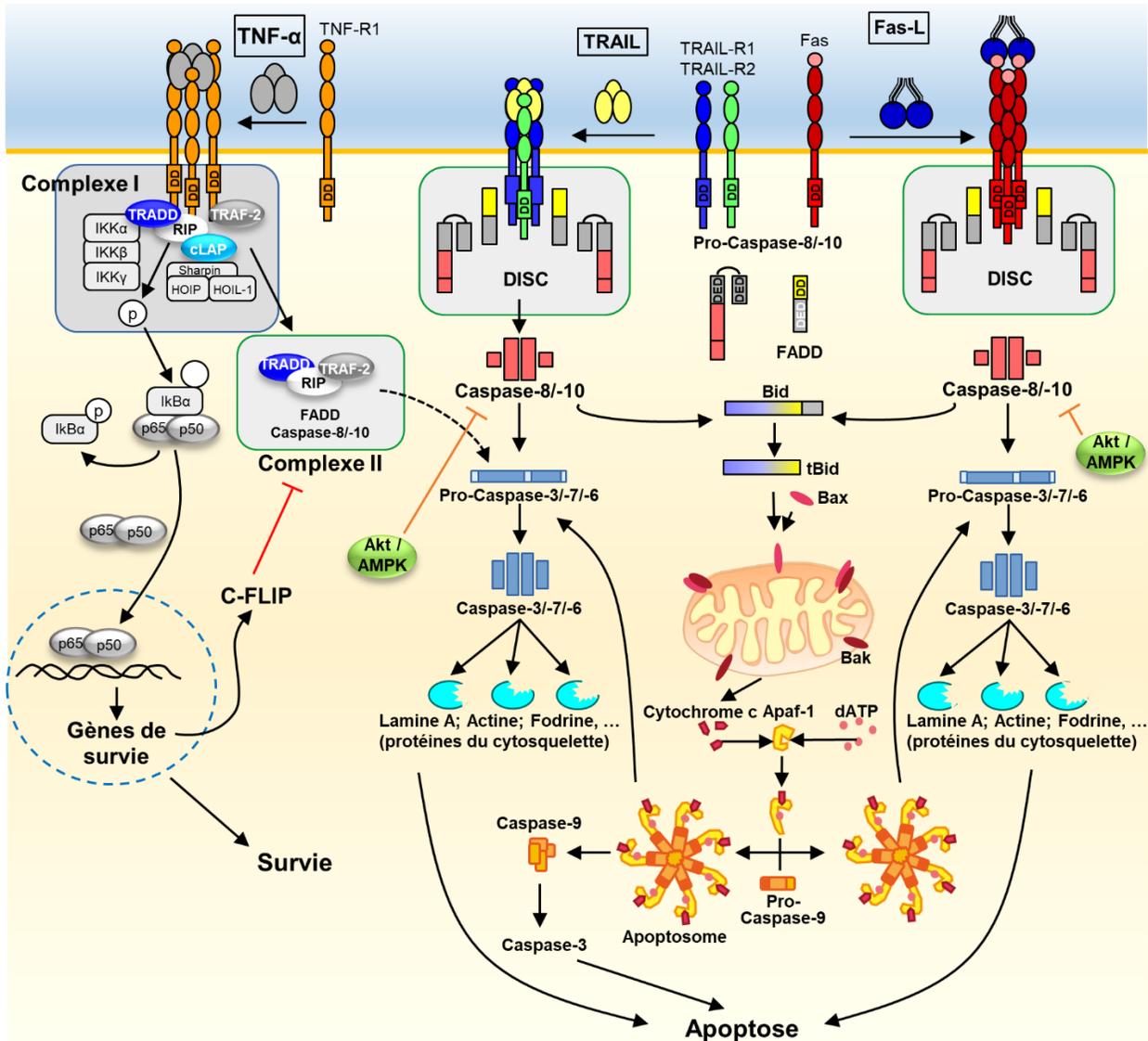
#### 1.2.3.1.4 La mort cellulaire

La production de ROS et l'épuisement de l'ATP perturbent les fonctions mitochondriales et initient l'apoptose de manière intrinsèque. On observe d'abord une activation des protéines cytosoliques BH3 (*B cell leukemia/lymphoma-2 homology domain 3*), tels que Bim (*pro-apoptotic Bcl-2-family protein*), Bad (*Bcl-2-associated death promoter protein*) et Bik (*Bcl-2 interacting killer*), qui activeront à leur tour la protéine pro-apoptotique Bax (*Bcl-2-associated X protein*). Une fois activée, Bax sera déplacée du milieu cytosolique à la membrane externe mitochondriale pour former un oligomère avec Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), dont l'activité est restreinte par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (*B cell*

*leukemia/lymphoma-2*) et Bcl-xL (*B cell leukemia/lymphoma-x, long isoform*) (Whelan et coll., 2010). De plus, l'activation de la voie PI3K/Akt conduit à la phosphorylation et à l'inactivation de Bad et de Bax (Hausenloy et Yellon, 2004; Zha et coll., 1996), ce qui empêche le changement de conformation de Bad (Majewski et coll., 2004; Tsuruta et coll., 2002) et la formation du complexe pro-apoptotique à la membrane mitochondriale. Il s'ensuivra une perméabilisation, un gonflement de la mitochondrie, la relâche dans le cytosol de d'autres protéines pro-apoptotiques, notamment le cytochrome c, Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI*) et l'endonucléase-G, et l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm). Le PTPm est un complexe protéique situé dans la membrane mitochondriale interne qui reste fermé en condition normale et qui lie la protéine anti-apoptotique Bcl-xL. Le PTPm est composé de l'ATP synthase, de l'adénine nucléotide translocase (ANT), du transporteur de phosphate inorganique (PiC, *inorganic phosphate carrier*) et de la cyclophiline D, une peptidyl-prolyl cis-transisomérase (Morciano et coll., 2017). L'ouverture du PTPm permet le passage de toutes molécules plus petites que 1,5 kDa et conduit à une dissipation du potentiel membranaire. Lors d'un IAM, l'augmentation de calcium et de phosphate intracellulaire cause leur liaison à l'ATP synthase et au PiC, respectivement, et, couplé à la production élevée de ROS, provoque l'ouverture du PTPm. Une déplétion d'ATP qui cause la déphosphorylation de l'ATP synthase entraîne aussi l'ouverture du pore. Toutefois, le PTPm est inhibé dans un milieu acide et son ouverture n'est pas très observée pendant l'ischémie. Une fois dans le cytosol, le cytochrome c se lie à la protéine Apaf1 (*apoptotic protease activating factor-1*) et recrute la pro-caspase-9 et l'active pour former un complexe appelé l'apoptosome. L'apoptosome activera les caspases-3, -6 et -7 qui causeront la protéolyse de plusieurs protéines, particulièrement des protéines membranaires, ce qui résultera en la mort cellulaire par apoptose de manière intrinsèque (Dorweiler et coll., 2007). De façon parallèle, la protéine Smac/DIABLO dégrade les protéines inhibitrices des caspases, telles que XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) qui inhibe les caspases-3, -7 et -9, tandis que l'endonucléase-G se rend au noyau et cause la fragmentation de l'ADN (Whelan et coll., 2010). Encore une fois, l'activation d'Akt présente des effets anti-apoptotiques puisqu'elle peut phosphoryler la pro-caspase-9 et causer son inhibition, l'empêchant ainsi d'activer les caspases en aval (Cardone et coll., 1998). L'apoptose peut aussi être initiée de manière extrinsèque par l'activation des récepteurs de la superfamille de TNF, soit FAS, TRAIL

(*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) (Guicciardi et Gores, 2009) et TNF- $\alpha$  (Kleinbongard et coll., 2011), sur le sarcolemme. L'activation de ces récepteurs résultera en leur trimérisation, puis au recrutement des protéines contenant des domaines de mort (DD, *death domain*) telles que FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) pour le TNF- $\alpha$ , et TRADD (*TNF receptor superfamily 1A-associated via death domain*) pour les ligands de FAS et de TRAIL, au niveau du récepteur. Le complexe FAS ou TRAIL, avec FADD, recrutera la pro-caspase-8 et la pro-caspase-10 pour former un complexe appelé DISC (*death inducing signaling complex*) et activera la caspase-8 et la caspase-10. D'une part, les caspases-8 et -10 activeront les caspases-3, -6 et -7 et d'autre part, elles cliveront Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) pour obtenir sa forme tronquée, t-Bid, qui activera à son tour la protéine pro-apoptotique Bax afin d'initier la voie apoptotique intrinsèque telle que décrite précédemment (Whelan et coll., 2010). La voie de signalisation issue de l'activation du récepteur TNF- $\alpha$  est plus complexe et peut mener soit à l'apoptose ou à la survie cellulaire. D'abord, la liaison de TNF- $\alpha$  sur le TNF-R1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*) stimule la formation du complexe I, qui inclue les protéines TRADD, la sérine thréonine kinase RIP1 (*receptor interacting protein 1*), la TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*), et les ubiquitines ligases E3 cIAP-1 et -2 (*inhibitor of apoptosis proteins*). Les cIAP-1 et -2 initieront l'ubiquitination de RIP1 et TRAF2 qui recruteront et activeront TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1), une MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), liée à TAB (*TAK1-binding protein*). La TAK1 phosphoryle ensuite le complexe IKK (*inhibitor of  $\kappa$ B kinase*) composé des sous-unités IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\gamma$ /NEMO (*NF-kappa-B essential modulator*), afin de phosphoryler à son tour I $\kappa$ B $\alpha$  (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), qui sera rapidement ubiquitiné et dégradé. Ce processus lève l'effet inhibiteur de I $\kappa$ B $\alpha$  et libère le complexe formé des sous-unités p65/p50/p52 de NF $\kappa$ B, qui se déplacera au noyau pour stimuler la transcription des gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-XL et c-FLIP (*FADD-Like IL-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein*), promouvant la survie cellulaire. Toutefois, le complexe I peut transiter vers le complexe II après sa dissociation du TNF-R1, puis de la déubiquitination de RIP1 suivie du recrutement de FADD et des pro-caspases-8 et -10. Une fois les caspases-8 et -10 activées, le complexe II agit de manière similaire au complexe DISC des récepteurs TRAIL et Fas et initiera l'apoptose. Un inhibiteur potentiel de la voie apoptotique extrinsèque est la c-FLIP qui est transcrite par NF $\kappa$ B et qui se lie sur le complexe-II du TNFR

et le complexe DISC des récepteurs Fas et TRAIL, empêchant ainsi la caspase-8 de se lier (figure 22) (Whelan et coll., 2010). L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire hautement régulé qui mène à la dégradation cellulaire sous forme de corps apoptotiques couverts d'une membrane. Les macrophages élimineront les corps apoptotiques sans provoquer une réponse inflammatoire. Toutefois, l'apoptose requiert de l'ATP, sans quoi le mécanisme pour maintenir l'intégrité de la cellule est perdu et le processus de la nécrose est activé (Hamacher-Brady et coll., 2006).



**Figure 22. Voies de signalisation menant à l'apoptose**

AMPK, protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate; Apaf-1, *apoptotic peptidase activating factor 1*; Bak, *BCL2 antagonist/killer 1*; Bax, *BCL2-associated X protein*; Bid, *BH3 interacting domain death agonist*; c-FLIP, *cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein*; cLAP, *CARD-like apoptotic proteins*; DD, domaine de mort (*death domain*); FADD, *Fas associated via death domain*; DISC, *Death-inducing signaling complex*; FasL, *Fas ligand*; HOIL-1, ligase E3 HOIL-1; HOIP, ligase E3 Hoip; IKK, I $\kappa$ B kinase ; p50, NF- $\kappa$ B1; p65, RelA; RIP, *receptor interacting protein*; Sharpin, *SHANK-associated RH domain interacting protein*; tBid, *truncated BH3 interacting domain death agonist* TNF, *tumor necrosis factor*; TRADD, TNFRSF1A (*TNF receptor superfamily member 1A*) associated via death

domain; TRAF, *TNF receptor-associated factor*; TRAIL, *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. Figure modifiée et traduite de (Micheau et coll., 2013).

La nécrose cellulaire est caractérisée par le relâchement du contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire, ce qui initiera une réponse inflammatoire. L'activation des récepteurs conduisant à la mort cellulaire ne conduit pas seulement à l'apoptose, mais peut aussi mener à la survie, la prolifération ou la nécrose. Dans le cas du TNF- $\alpha$ , sa liaison avec le TNF-R1 produit peu de mort cellulaire, puisque les voies de survie et de mort cellulaire sont activées. Dans le cas où le mécanisme de survie cellulaire est inhibé, on observera une mort cellulaire par apoptose. Si en plus les caspases sont inhibées, RIP1 dans le complexe II recrute alors RIP3 qui s'autophosphoryle. Une fois activé, ce nouveau complexe, le nécrosome, recrute MLKL (*Mixed Kinase Domain Like protein*) et migre vers les membranes et cause la formation de pores. Ceci résulte en un influx de sodium, de calcium, en la déplétion d'ATP et en la production de ROS et on observera alors une mort cellulaire par nécrose (Whelan et coll., 2010).

#### **1.2.3.1.5 L'activité nerveuse sympathique**

Les dommages liés à l'IAM sont exacerbés par une stimulation accrue et soutenue de l'activité des nerfs sympathiques (Jardine et coll., 2005). Les nerfs sympathiques cardiaques sont responsables du contrôle de la fonction cardiaque, mais leur stimulation au début de l'occurrence d'un IAM provoque des arythmies, conduisant à l'occasion à un arrêt cardiaque soudain et au décès (Kaye et coll., 1995). L'adrénaline et la noradrénaline sont toutes les deux relâchées par les glandes surrénales après la stimulation par les nerfs sympathiques préganglionnaires lors de l'IAM. Toutefois, la source principale de la noradrénaline provient des fibres postganglionnaires des nerfs sympathiques qui innervent les vaisseaux sanguins (Mao et coll., 2012).

La stimulation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques par les catécholamines au niveau des cardiomyocytes inhibe la signalisation de l'insuline en diminuant la phosphorylation de ERK1/2 et JNK, diminuant l'entrée du glucose et pouvant mener à la résistance à l'insuline (Morisco et coll., 2007). De plus, la liaison des catécholamines sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques exprimés

par les adipocytes stimulera la lipolyse (détails à la section 1.1.5.3.2 précédente), favorisant l'internalisation des acides gras dans les cardiomyocytes (Jocken et Blaak, 2008; Knudtzon, 1984). L'IAM est un stress qui peut faire augmenter les concentrations basales d'AGNE de 0,2-0,6 mM à 2 mM (Kurien et Oliver, 1971; Stanley et coll., 2005). L'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques sur les cellules bêta du pancréas couplé à la protéine  $G_{\alpha i}$  inhibe la relâche de l'insuline (Ito et coll., 2017; Knudtzon, 1984), tandis que la stimulation des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sur les cellules hépatiques stimule la relâche de glucose après la dégradation de ses réserves de glycogène et la stimulation de la gluconéogenèse (Barth et coll., 2007; Knudtzon, 1984). Globalement, on observe plus d'acides gras et de glucose en circulation, mais moins d'insuline, ce qui affectera négativement le métabolisme cardiaque lors de la reperfusion (1.2.3.2).

### **1.2.3.2 La reperfusion d'un cœur en ischémie**

La reperfusion est nécessaire à la survie des cellules affectées par une ischémie. La nécrose cellulaire est plus importante et marquée pendant les premières heures après l'occlusion de l'artère coronaire (Boersma et coll., 1996) et peut débuter après seulement 20 minutes d'ischémie (Ferrari et coll., 2017). La rapidité pour rétablir le flux sanguin est donc cruciale à la survie du patient en réduisant la taille de l'infarctus et en préservant la fonction contractile des cardiomyocytes (Gersh et coll., 2005). Il est reconnu depuis longtemps que l'efficacité de la reperfusion dépend grandement de la durée et de la sévérité de l'ischémie (Jennings et Reimer, 1983). Paradoxalement, la reperfusion d'une région ischémisée cause une deuxième vague de dommages qui peut compter pour presque 50% de la mort cellulaire totale (Bagai et coll., 2014). Ce phénomène est appelé « lésions de la reperfusion » et il n'existe actuellement aucun agent pharmacologique efficace pouvant les prévenir en clinique.

#### **1.2.3.2.1 Métabolisme cardiaque à la reperfusion**

Le rétablissement du flux sanguin réintroduit l'apport en nutriments. Toutefois, l'induction de la lipolyse par le tissu adipeux lors de l'ischémie pousse le myocarde à internaliser les acides gras qui se retrouvent en grande quantité dans la circulation. L'activation de l'AMPK

observée pendant l'ischémie persiste jusqu'à la reperfusion et promeut davantage l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et leur oxydation, au dépend de l'oxydation du glucose (Kudo et coll., 1995; Miller et coll., 2008). Ceci cause une inhibition de l'oxydation du glucose et de son entrée dans les cardiomyocytes, dictée par le cycle de Randle (décrit à la section 1.2.1.3). La bêta-oxydation des acides gras au dépend de l'oxydation du glucose présente un couplage moins efficace entre l'utilisation de l'oxygène et la production d'ATP, et conduit à une production plus élevée de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale nuisant à la récupération de la fonction cardiaque (figure 23) (Lopaschuk et coll., 2010).

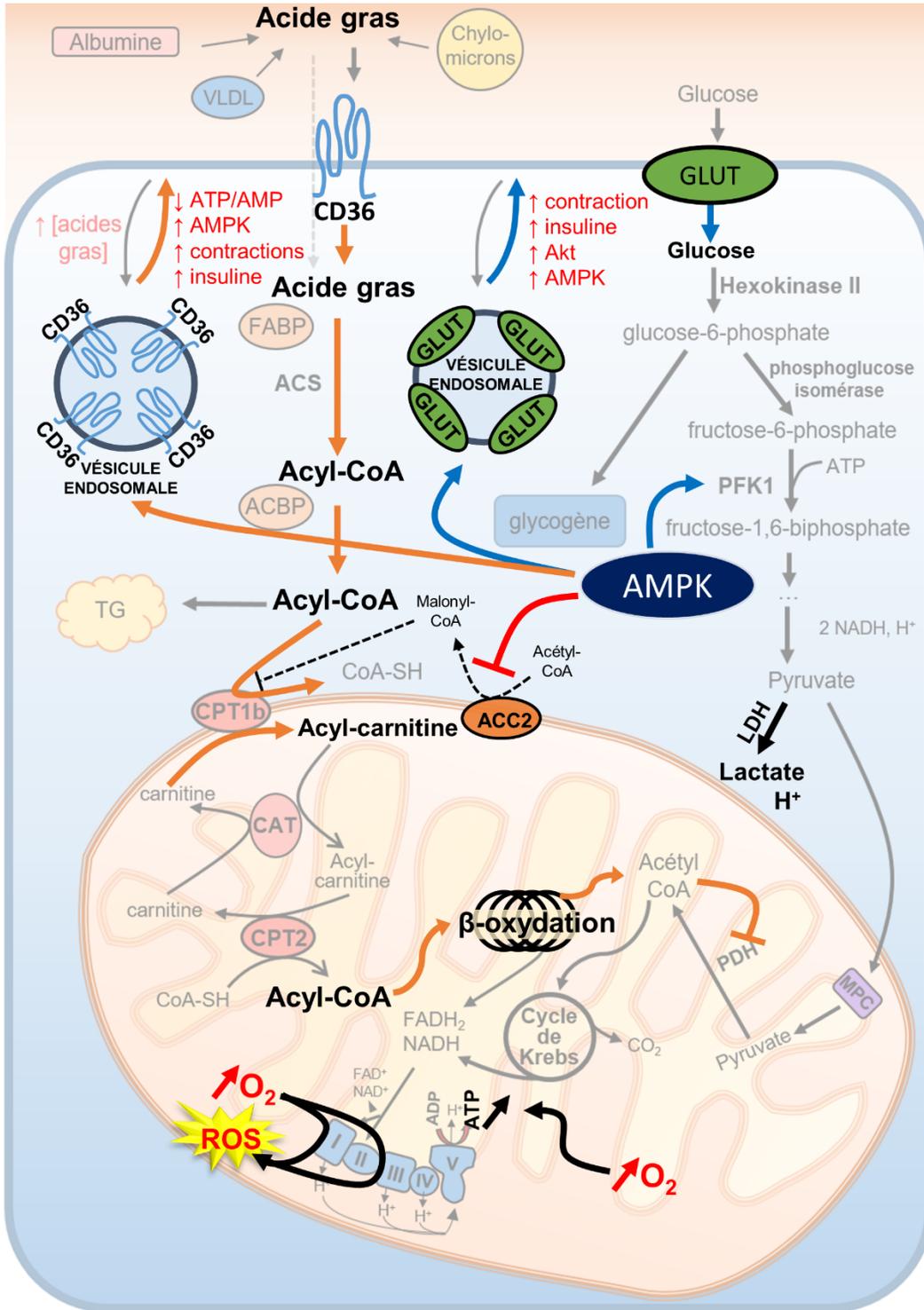


Figure 23. Voies métaboliques du glucose et des acides gras dans un coeur reperfusé après une ischémie

ACBP, *acyl-CoA binding protein*; ACC, acétyl-CoA carboxylase; ACS, acyl-CoA synthétase; AMP, adénosine monophosphate; AMPK, protéine kinase activée par l'AMP; ATP, adénosine triphosphate; CAT, carnitine acyl-carnitine translocase; CPT1b, carnitine palmitoyltransférase 1b; CPT2, carnitine palmitoyltransférase 2; FABP, *fatty acid binding protein*; FAD, flavine adénine dinucléotide; FADH<sub>2</sub>, flavine adénine dinucléotide réduite; GLUT, transporteur du glucose; LDH, lactate déshydrogénase; MPC, *mitochondrial pyruvate carrier*; NAD, nicotinamide adénine dinucléotide; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduit; O<sub>2</sub>, oxygène; PDH, pyruvate déshydrogénase; PFK1, phosphofructokinase-1; ROS, *reactive oxygen species*; VLDL, *very low density lipoprotein*. Figure inspirée de (Lopaschuk et coll., 2010)

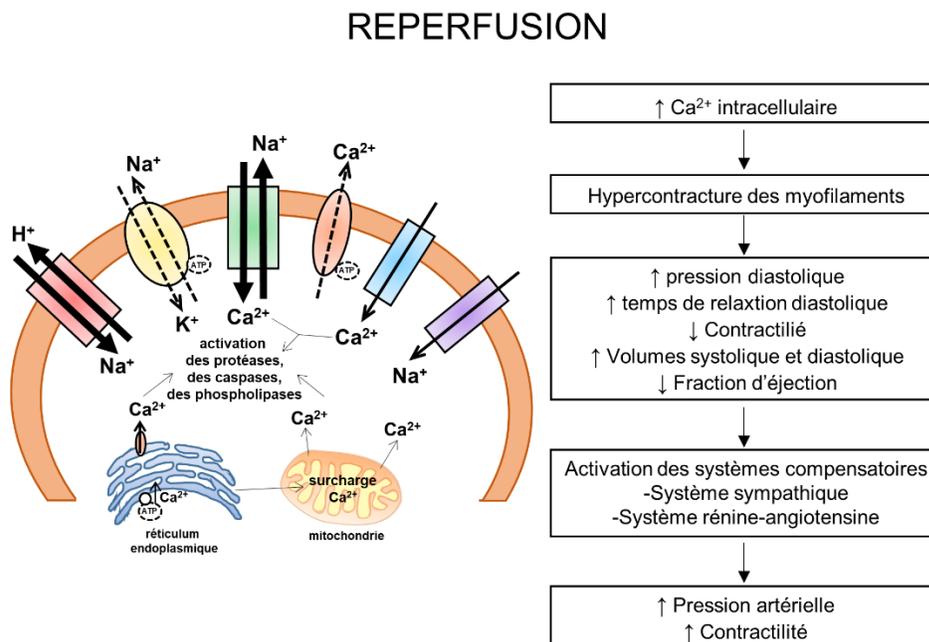
### 1.2.3.2.2 Perturbations ioniques et dysfonction cardiaque

La reperfusion rétablira le flux sanguin et permettra d'évacuer les ions extracellulaires qui se sont accumulés pendant l'ischémie. Les cellules recommenceront alors à éliminer les H<sup>+</sup> à l'aide du NHE afin de rétablir un pH normal dans le cytosol. Toutefois, cela conduit à une accumulation additionnelle de Na<sup>+</sup> intracellulaire et à un œdème intracellulaire (Garcia-Dorado et coll., 2012). En effet, la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase est responsable d'éliminer le surplus de Na<sup>+</sup> intracellulaire, mais son activité est perturbée par la faible quantité d'ATP, ainsi que le rétablissement du pH qui active les calpaïnes qui attaquent le cytosquelette (Hernando et coll., 2010). Le sodium est donc éliminé par le NCX, qui résulte en une entrée accrue de calcium, déjà élevé dans la cellule pendant l'ischémie. Les ATP qui sont produites après la réintroduction de l'oxygène seront utilisées par les pompes SERCA. Toutefois, la quantité de calcium intracellulaire excède la capacité d'entreposage du réticulum sarcoplasmique, par conséquent, celui-ci relâchera le calcium dans le cytosol par des récepteurs de la ryanodine. On observe alors un cycle futile d'internalisation et de relâche de calcium de manière concomitante à un gaspillage d'ATP (Figure 24).

L'augmentation de calcium intracellulaire augmente la rigidité des muscles cardiaques, causant une augmentation de la pression diastolique dans le ventricule gauche (Holmes et coll., 2005). De plus, la perturbation dans le flux du calcium intracellulaire diminue le synchronisme et la sensibilité des myofilaments pour le calcium, causant un retard ou une relaxation

incomplète durant la diastole (Labovitz et coll., 1987; Thune et Solomon, 2006) et une diminution de la contractilité cardiaque (Bers, 2002). La diminution de la contractilité cardiaque observée est une caractéristique marquante de la pathologie de l'I/RM (Saeed et coll., 2013) et elle peut permettre de prédire les chances de survie après un IAM (Burns et coll., 2002). La diminution de la contractilité cardiaque est accompagnée d'une augmentation des volumes systolique et diastolique, mais d'une diminution de la fraction d'éjection (FE) (Saeed et coll., 2013). Des mécanismes compensatoires, dont notamment le système sympathique (Hara et Abiko, 1996; Tawa et coll., 2012) et le système rénine-angiotensine (Agrawal et coll., 2016), sont alors activés pour faire augmenter la pression artérielle et la contractilité du myocarde.

En plus de causer l'hypercontracture des myofilaments, la forte concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire lors de la reperfusion porte les protéases à lyser davantage les composantes du cytosquelette, les endonucléases à initier l'apoptose et la phospholipase A2 à produire des métabolites de l'acide arachidonique, tels que le leucotriène B4 (LTB4), qui induit l'adhésion et l'activation des neutrophiles et la relâche additionnelle de ROS (Dorweiler et coll., 2007).

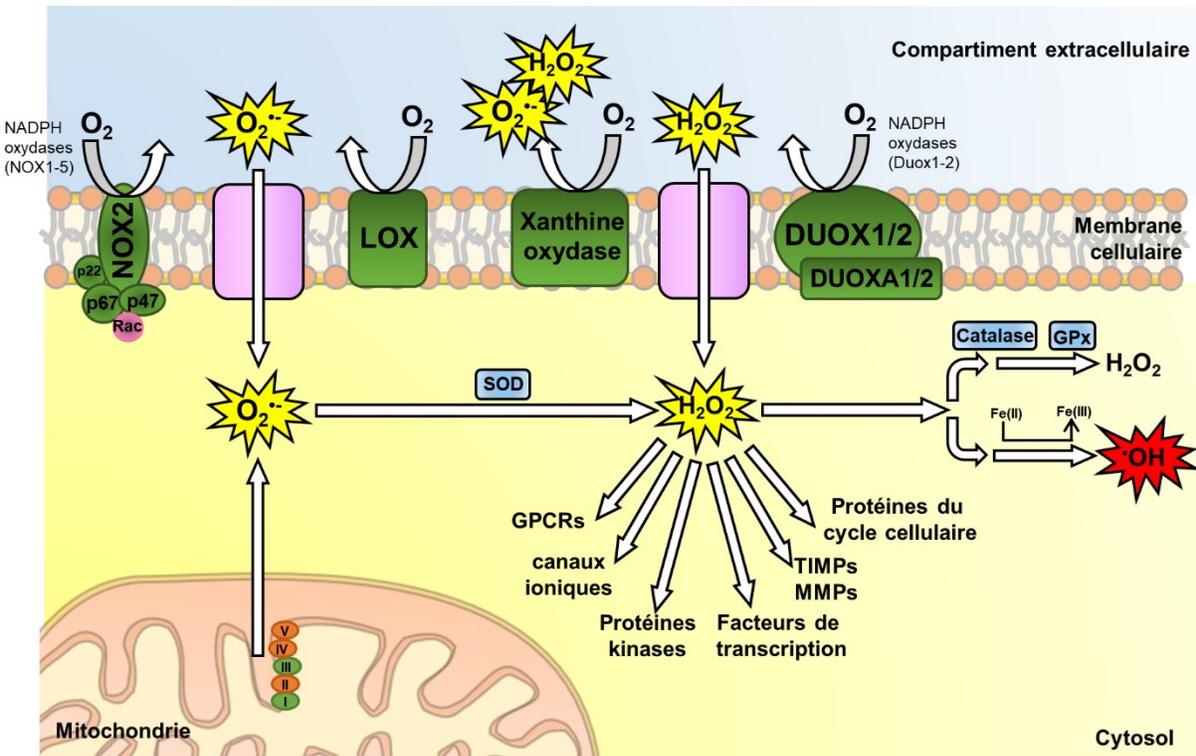


**Figure 24. Perturbation des ions dans les cardiomyocytes en conditions d'ischémie et de reperfusion**

Figure modifiée et traduite de (Kalogeris et coll., 2012).

### 1.2.3.2.3 Le stress oxydatif

La reperfusion réintroduit aussi subitement l'oxygène, ce qui active la xanthine oxydase (Thompson-Gorman et Zweier, 1990) et la NOX (Matsushima et coll., 2014) et rend le couplage de la chaîne respiratoire mitochondriale inefficace en entraînant la production de ROS de manière encore plus accrue que pendant l'ischémie. La famille des NOX comporte 7 membres (NOX1-7), dont les NOX1, NOX2 et NOX4 qui sont exprimées dans les cardiomyocytes (Cadenas, 2018). Des études avec des souris déficientes en l'une ou plusieurs de ces trois NOX ont montré que celles-ci sont toutes impliquées dans la production de ROS dans la pathologie de l'I/RM (Braunersreuther et coll., 2013; Matsushima et coll., 2013; Matsushima et coll., 2014). Contrairement à la NOX4, qui est constitutivement active, la phosphorylation des sous-unités cytosoliques des NOX1 et NOX2 est requise pour qu'elles soient recrutées à la membrane sarcolemmique et forment un complexe actif qui réduit l'O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Ma et coll., 2017). À ce moment-là, le système de défense anti-oxydant, qui comprend entre autres la SOD, la catalase et la GSH-Px, devient débordé et n'est plus capable d'éliminer les ROS. L'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entraîne la génération de radicaux hydroxyl (•OH) qui sont très réactifs causant des dommages aux protéines et induisant la peroxydation des lipides. L'anion superoxyde est aussi produit à partir d'iNOS et peut réagir avec le NO pour former le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) qui finira par se dissocier en dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) et en ion hydroxyl (OH<sup>-</sup>), très toxiques pour la cellule (figure 25). Par ailleurs, cette réaction cause une diminution de la disponibilité du NO, ce qui diminue l'activation de la protéine kinase G (PKG). Dans les cardiomyocytes, la PKG peut activer la PKCε mitochondriale et empêcher l'ouverture du PTPm (Ong et coll., 2015). De plus, la PKG est responsable de phosphoryler la MLCP (*myosin light chain phosphatase*) qui déphosphoryle la MLC (*myosin light chain*) et cela résulte en une relaxation des muscles lisses. La diminution de NO conduit donc à une inhibition de la vasodilatation et à une reperfusion inadéquate (Dorweiler et coll., 2007).



**Figure 25. Source de production de ROS et système anti-oxydant à la reperfusion**

GPx, glutathione peroxydase, LOX, *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*; NOX, NADPH oxydases; MMP, métalloprotéinase matricielle; SOD, superoxyde dismutase; TIMP, inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases. Figure modifiée et traduite de (Ovrevik et coll., 2015).

Le stress oxydatif élevé cause aussi des dommages au réticulum sarcoplasmique et à la membrane sarcolemmique augmentant davantage la concentration de calcium intracellulaire. Les ROS poussent les mitochondries à ouvrir leur PTPm après une accumulation accrue de calcium dans leur matrice. La perméabilité aux protons cause un découplage de la phosphorylation oxydative et un arrêt de la production d'ATP. L'augmentation du gradient dans la matrice cause une entrée d'eau et donc un gonflement des mitochondries qui peut mener éventuellement à leur rupture. Le contenu des mitochondries est alors relâché dans le cytosol, ce qui inclut le calcium, mais aussi des protéines pro-apoptotiques qui initieront l'apoptose, qui peut dégénérer en nécrose cellulaire (Halestrap, 2010).

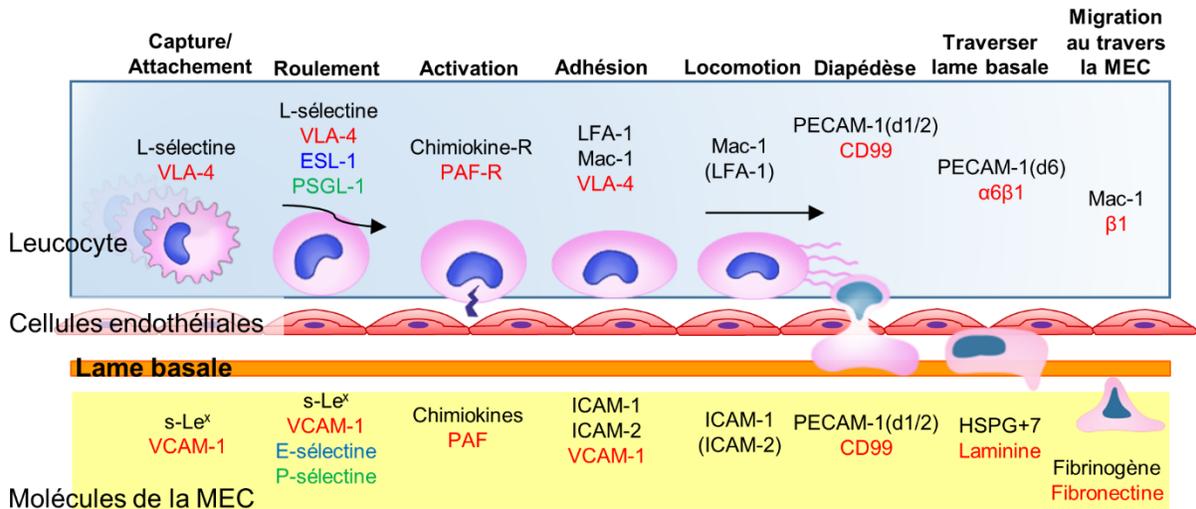
#### 1.2.3.2.4 L'inflammation

La mort cellulaire des cardiomyocytes cause la relâche d'une variété de DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), tels que l'ADN, l'acide ribonucléique (ARN), l'acide hyaluronique, l'acide urique, la  $\beta$ -amyloïde, les HSP (*heat shock proteins*) et le HMGB1 (*high mobility group box 1*), qui peuvent être reconnus par les PRRs (*pattern recognition receptors*), tels que les TLRs et les RAGE (*receptors for advanced glycation end-products*), exprimés par les leucocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Bliksoen et coll., 2012; Ding et coll., 2013; Park et coll., 2004; Prabhu et Frangogiannis, 2016; Takagi et coll., 2017; Taylor et coll., 2004; Zhang et coll., 2010). Les DAMPs, ainsi que les ROS, activent le NF $\kappa$ B (Gloire et coll., 2006; Morgan et Liu, 2011) et conduit à la transcription et à la sécrétion de cytokines, telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), de chimiokines, telles que CCL2, IL-18, CXCL1 (*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*) et CXCL2, et à l'expression de molécules d'adhérence, telles que les sélectines, VCAM-1 et ICAM-1 (Liu et coll., 2017). La mort cellulaire cause aussi la relâche d'ATP, qui est aussi classée parmi les DAMPs. L'ATP peut lier le récepteur P2X7 et activer le NLRP3 (*NOD (nucleotide oligomerization domain)-like receptor family, pyrin domain containing 3*), une protéine exprimée après l'activation de NF $\kappa$ B (Baron et coll., 2015; Jha et coll., 2017; Mariathasan et coll., 2006). La présence de ROS en condition d'I/RM contribue aussi à l'activation de NLRP3 (Iyer et coll., 2013; Minutoli et coll., 2016; van Hout et coll., 2017). Le NLRP3 formera un complexe avec l'ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (caspase activation and recruitment domains)*) et la pro-caspase-1, nommé inflammasome. La pro-caspase-1 subira un clivage autocatalytique qui la rendra active. La caspase-1 mature pourra cliver et activer à son tour les cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18 qui seront ensuite relâchées dans le milieu extracellulaire (Coll et coll., 2015; Guo et coll., 2015). Des études ont montré que des souris déficientes en TLR4 (Oyama et coll., 2004) ou en TLR2 (Arslan et coll., 2010) présentaient une diminution des lésions de l'I/RM associée avec une baisse de la réponse inflammatoire. La formation d'un complexe du co-récepteur CD36 avec les TLR4/6 (Sheedy et coll., 2013) ou TLR2/6 avec le CD14 comme intermédiaire (Jimenez-Dalmaroni et coll., 2009; Triantafilou et coll., 2006) suggère que cibler le CD36 serait une stratégie intéressante pour diminuer l'activation des TLRs lors de l'I/RM. La sécrétion du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$ , après la stimulation des TLRs, peut subvenir de manière autocrine et

paracrine. Ils se lient à leur récepteur, le TNF-R1 et le récepteur de l'interleukine-1 (IL-1R), respectivement, et activent NFκB et la cascade d'apoptose. Le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-1β peuvent recruter les neutrophiles, les plaquettes et les monocytes et induire l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales (Arango Duque et Descoteaux, 2014; Ed Rainger et coll., 2015).

Les neutrophiles sont la première ligne de défense après l'invasion d'un agent pathogène ou en réponse à des dommages tissulaires (Soehnlein et Lindbom, 2010; Yan et coll., 2013). L'accumulation de neutrophiles a lieu dans les heures qui suivent l'IAM et atteint son maximum après 1-3 jours en absence de reperfusion. La reperfusion accélère l'infiltration des neutrophiles dans la région ischémisée du myocarde et atteint son pic une heure suite à la reperfusion (Piper et Preusse, 2012). Les neutrophiles sont recrutés au site inflammatoire en réponse à une forte concentration de cytokines et de chimiokines au niveau du myocarde endommagé. À leur arrivée, les neutrophiles vont d'abord rouler puis lier la glycoprotéine sialyl-Lewis X, la sélectine-P et la sélectine-E exprimées à la surface des cellules endothéliales, à l'aide de leurs molécules d'adhérence membranaire, la sélectine-L, l'ESL-1 (*E-selectin ligand-1*) et la PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), respectivement. La présence de chimiokines sécrétées et maintenues à la surface endothéliale stimule les neutrophiles à exprimer des récepteurs aux chimiokines et à devenir davantage activés, entraînant un changement de conformation des intégrines Mac-1 (*Macrophage-1 antigen*) et LFA-1 (*leukocyte function associated antigen-1*) qui, en plus du VLA-4 qui lie VCAM-1, leur permet de lier leurs ligands ICAM-1 et ICAM-2 sur les cellules endothéliales. Ceci permet l'adhésion des neutrophiles à la surface endothéliale, qui pourront par la suite traverser cette monocouche par diapédèse (figure 26) (Muller, 2013). Une fois au site de l'infarctus, les neutrophiles peuvent phagocyter les débris cellulaires, sécréter des protéases et des métalloprotéinases (MMP), telles que la collagénase, l'élastase, la MMP-2 et la MMP-9 qui dégradent la matrice extracellulaire et sécrètent des ROS, principalement par l'action de NOX2 (Raedschelders et coll., 2012). La formation de NETs (*neutrophil extracellular traps*), une fonction anti-microbiale des neutrophiles est aussi observée au moment de la reperfusion suite à un IAM. Les NETs sont composés de chromatines (forme condensée de l'ADN) recouvertes de protéines granulaires, telles que l'élastase, la cathepsin G et la myéloperoxidase (MPO). Les NETs peuvent attacher les érythrocytes, favorisant la formation

de thrombus et activant le phénomène de non-reperfusion (Ge et coll., 2015). Une autre caractéristique des neutrophiles est qu'ils expriment aussi des TLRs, activant ainsi des cascades de signalisation conduisant à la sécrétion de cytokines, de chimiokines et de médiateurs lipidiques, tels que le PAF (*platelet-activating factor*) et le LTB<sub>4</sub>, qui attireront davantage de neutrophiles et de monocytes au site inflammatoire (Rodrigues et Granger, 2010; Vinten-Johansen, 2004). Les monocytes infiltreront la zone infarctée du myocarde peu après les neutrophiles et mûrissent en macrophages grâce aux facteurs de croissance, tels que le M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) et GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*). Une fois différenciés, les macrophages peuvent phagocyter les débris cellulaires et les cellules apoptotiques (Bonaventura et coll., 2016; Nahrendorf et coll., 2010). La liaison de la TSP1 sur le récepteur CD36 exprimé par les macrophages et sur le CD47 exprimé par les neutrophiles apoptotiques permet de faciliter leur phagocytose et la résolution de l'inflammation (Lopez-Dee et coll., 2011). Bien que le recrutement des neutrophiles et des macrophages lors de la réponse inflammatoire soit essentiel pour la réparation des tissus après des dommages, une infiltration trop importante de neutrophiles exacerbe les dommages au myocarde après une I/RM et cause des dommages collatéraux importants autour de la zone infarctée (Kvietys et Granger, 2012).



**Figure 26. Migration leucocytaire au site inflammatoire**

$\alpha 6\beta 1$ , (ou VLA6, *very late antigen 6*) intégrine liant la laminine;  $\beta 1$ , intégrines faisant partie de la famille de  $\beta 1$ ; ESL-1, ligand-1 de la E-sélectine; ICAM, molécule d'adhérence intercellulaire; HSPG, *heparan sulfate proteoglycan*; LFA-1, antigène-1 associé à la fonction des lymphocytes; Mac-1, antigène de macrophage-1; PAF, facteur d'activation plaquettaire; PAFR, récepteur du facteur d'activation plaquettaire; PECAM-1, molécule d'adhérence des cellules endothéliales et des plaquettes; PSGL-1, ligand-1 de la glycoprotéine P-sélectine; s-Le<sup>x</sup>, antigène x de sialyl Lewis; VCAM-1, molécule-1 d'adhérence des cellules vasculaires; VLA-4, *very late antigen 4*; Figure modifiée et traduite de (Muller, 2013).

La reperfusion conduit aussi au dysfonctionnement des cellules endothéliales. La synthèse de NO, un élément vasodilatateur, par eNOS requiert son co-facteur tétrahydrobioptérine (BH4) qui le maintient sous forme de dimère. Sous cette forme, l'eNOS peut réduire l'oxygène et le transférer à son précurseur, l'aa L-arginine (Arg), afin de produire du NO et la L-citrulline. (Seal et Gewertz, 2005). En condition de reperfusion après une ischémie du myocarde, l'hypoxie et l'augmentation de TNF- $\alpha$  et de ROS en circulation augmente l'expression de l'arginase I et de iNOS dans les cardiomyocytes, diminuant la quantité de L-arginine disponible pour eNOS (Schluter et coll., 2015). De plus, l'oxydation de la BH4 par les ROS en dihydrobioptérine (BH2) change la forme dimérique de eNOS en forme monomérique. Ce découplage d'eNOS avec la L-arginine et la BH4 la conduit à réduire l'oxygène en O<sub>2</sub><sup>-</sup> plutôt que de synthétiser du NO, diminuant la vasodilatation et exacerbant le stress oxydatif à la

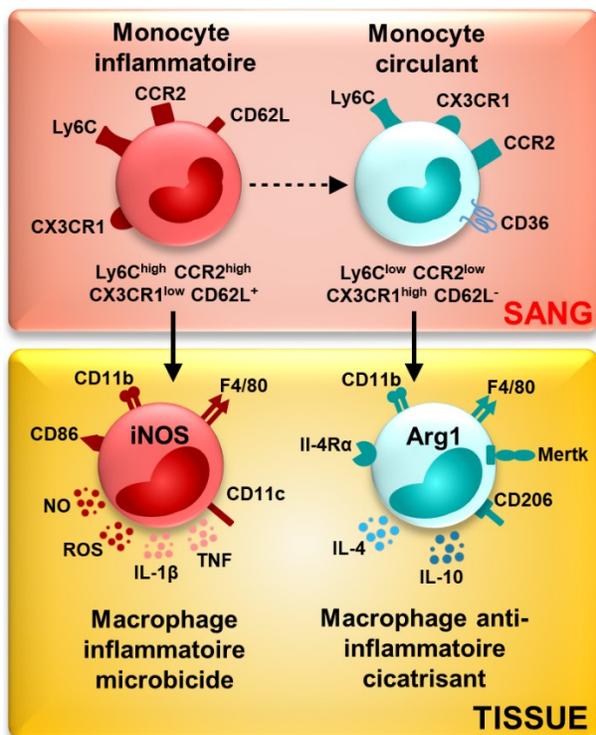
reperfusion (Verhaar et coll., 2004). Par ailleurs, l'I/RM cause des dommages aux cellules endothéliales, provoquant la sécrétion de l'endothéline-1 (ET-1), un puissant peptide vasoconstricteur, et inhibant la sécrétion de prostacycline (ou PGI<sub>2</sub>), un agent vasodilatateur. Addition de l'infiltration de leucocytes qui libèrent du LTB<sub>4</sub> et de la sérotonine, ainsi que de l'activation du système du complément en réponse à l'inflammation, peut conduire à des vasospasmes. De plus, l'activation de plaquettes par les ROS et le PAF cause la sécrétion de sérotonine et de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), un autre agent vasoconstricteur. Couplée à la baisse de NO et de prostacycline disponible, les plaquettes vont adhérer dans la région infarctée. Les plaquettes, de par l'expression d'intégrines, peuvent se lier au fibrinogène, aux leucocytes, aux cellules endothéliales et à d'autres plaquettes, ce qui accélère l'activation des facteurs de coagulation et possiblement la formation de microthrombus (Loubele et coll., 2009; Pawlinski et Mackman, 2009). Combiné avec l'œdème produit dans la zone à risque qui comprime les cellules, tous ces facteurs peuvent empêcher le sang de perfuser à nouveau les microvaisseaux, contribuant au phénomène de non-reperfusion (Dorweiler et coll., 2007).

Les ROS inactivent aussi les protéines phosphatases, ce qui maintient l'activité des MAPK p38 et JNK qui promeut l'activité apoptotique (Altamirano et coll., 2015). En effet, les protéines pro-apoptotiques, telles que Bax, Bak et Bid sont très sensibles aux réactions d'oxydo-réduction qui sont plus présentes à la reperfusion, associée à une augmentation des ROS intracellulaires (Kalogeris et coll., 2012). Les enzymes qui possèdent un centre de fer-sulfure, telles que l'aconitase, le fumarase, la NADH déshydrogénase et la créatine kinase, sont susceptibles d'être oxydées et inactivées (Raedschelders et coll., 2012). L'activité de l'aconitase est considérée comme un biomarqueur de la présence de ROS intracellulaires puisqu'il s'agit de l'enzyme la plus sensible à la présence de ROS (Tretter et Adam-Vizi, 2000).

#### **1.2.3.2.5 La cicatrisation tissulaire**

On peut observer un deuxième paradoxe dans la phase post-reperfusion. En effet, plusieurs des éléments responsables des lésions liées à la reperfusion sont aussi nécessaires à la réparation du tissu. Par exemple, les ROS peuvent induire l'angiogenèse par l'activation de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et de HIF (Cucoranu et coll., 2005; Maulik et Das,

2002; Ushio-Fukai, 2006). L'activation de la voie NFκB peut avoir un effet inhibiteur sur l'apoptose (section 1.2.3.1.4) (Whelan et coll., 2010). Les neutrophiles et les macrophages de type M1 qui phagocytent les neutrophiles apoptotiques sécrètent des cytokines et des médiateurs lipidiques anti-inflammatoires, tels que l'IL-10, le TGF-β, les lipoxines et les résolvines, ce qui freine la migration des neutrophiles, mais encourage la migration des monocytes au foyer inflammatoire; ces derniers activent la réparation tissulaire (Dalli et Serhan, 2016; Dawn et coll., 2004; Garcia-Bonilla et coll., 2014; Ma et coll., 2016; Soehnlein et Lindbom, 2010; Takahashi et coll., 2008). En effet, les monocytes recrutés au niveau de la région infarctée au début de la reperfusion sont différenciés majoritairement en macrophages de type M1 (Ly-6C<sup>hi</sup>) chez la souris en présence de CCL2 et d'IFN-γ et expriment iNOS de façon majoritaire qui convertit la L-arginine en NO cytotoxique. Par contre, pendant la phase de réparation, les monocytes ayant migré au site de l'IAM sont différenciés en macrophages de type M2 (Ly-6C<sup>lo</sup>) en présence des cytokines CX3CL1 (fractalkine ou *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*) et IL-4, ces derniers sécrétant des cytokines anti-inflammatoires qui expriment de façon plus abondante l'arginase-1, responsable de la synthèse du collagène à partir de la L-arginine (figure 27) (Bonaventura et coll., 2016; Nahrendorf et coll., 2007; Sanmarco et coll., 2017; van Amerongen et coll., 2007; Yang et Ming, 2014). Une étude récente a montré que l'expression du CD36 est importante pour la conversion des monocytes en macrophages de type 2 par l'activation du récepteur nucléaire Nr4a1. Le Nr4a1 cause la transcription de gènes cibles après la liaison sur le domaine NBRE (*NGFI-B (nerve growth factor-induced gene-B) responsive element*), ce qui inclut Mertk (*myeloid epithelial reproductive receptor tyrosine kinase*), un récepteur de phagocytose exprimé de manière prédominante à la surface des macrophages de type M2 (Dehn et Thorp, 2018). Ce groupe a montré que les souris déficientes en CD36 présentent plus de macrophages de type M1 dans la région infarctée suite à une I/RM, et un délai de la présence des macrophages de type M2, résultant en une prolongation de la réponse inflammatoire et du processus de guérison (Dehn et Thorp, 2018). Les cardiomyocytes adultes ne possèdent pratiquement aucune habileté de réplication et ne peuvent donc pas remplacer les cellules mortes (Soonpaa et Field, 1998). Les cellules mortes seront donc remplacées par du tissu cicatriciel fibreux qui ne possède aucune fonction contractile. La préservation de la structure et de la fonction cardiaque est donc l'objectif principal des thérapies.



**Figure 27. Polarisation et fonctions des macrophages M1 et M2**

Arg1, Arginase 1; CCR2, *C-C chemokine receptor type 2*; CX3CR1, *C-X3-C motif chemokine receptor 1*; CD206, *cluster of differentiation 206*; high, fortement exprimé; IL, interleukine; iNOS, *inducible nitric oxide synthase*; low, faiblement exprimé; Ly6C, *lymphocyte antigen 6 complex*; Mertk, *myeloid epithelial reproductive receptor tyrosine kinase*; NO, oxyde nitrique; ROS, espèces réactives de l'oxygène; TNF, *tumor necrosis factor*. Figure traduite de (Sanmarco et coll., 2017).

### 1.2.3.3 Le conditionnement ischémique

L'équipe de Jennings a remarqué que les patients qui ont souffert d'angine de poitrine avant un IAM présentaient moins de dommages au cœur. Des chiens ont donc été soumis à des cycles d'ischémie transitoire de cinq minutes en gonflant un ballon en aval du vaisseau occlus et ceux-ci ont présenté une réduction de la taille de l'infarctus de 75% (Murry et coll., 1986). Le preconditionnement ischémique mène à l'activation des récepteurs de l'adénosine, de la bradykinine et des opioïdes et à l'activation subséquente de voies de signalisation telles que PI3k (phosphoinositide 3-kinase)-Akt-eNOS qui activeront la PKC, ainsi que de JAK (janus

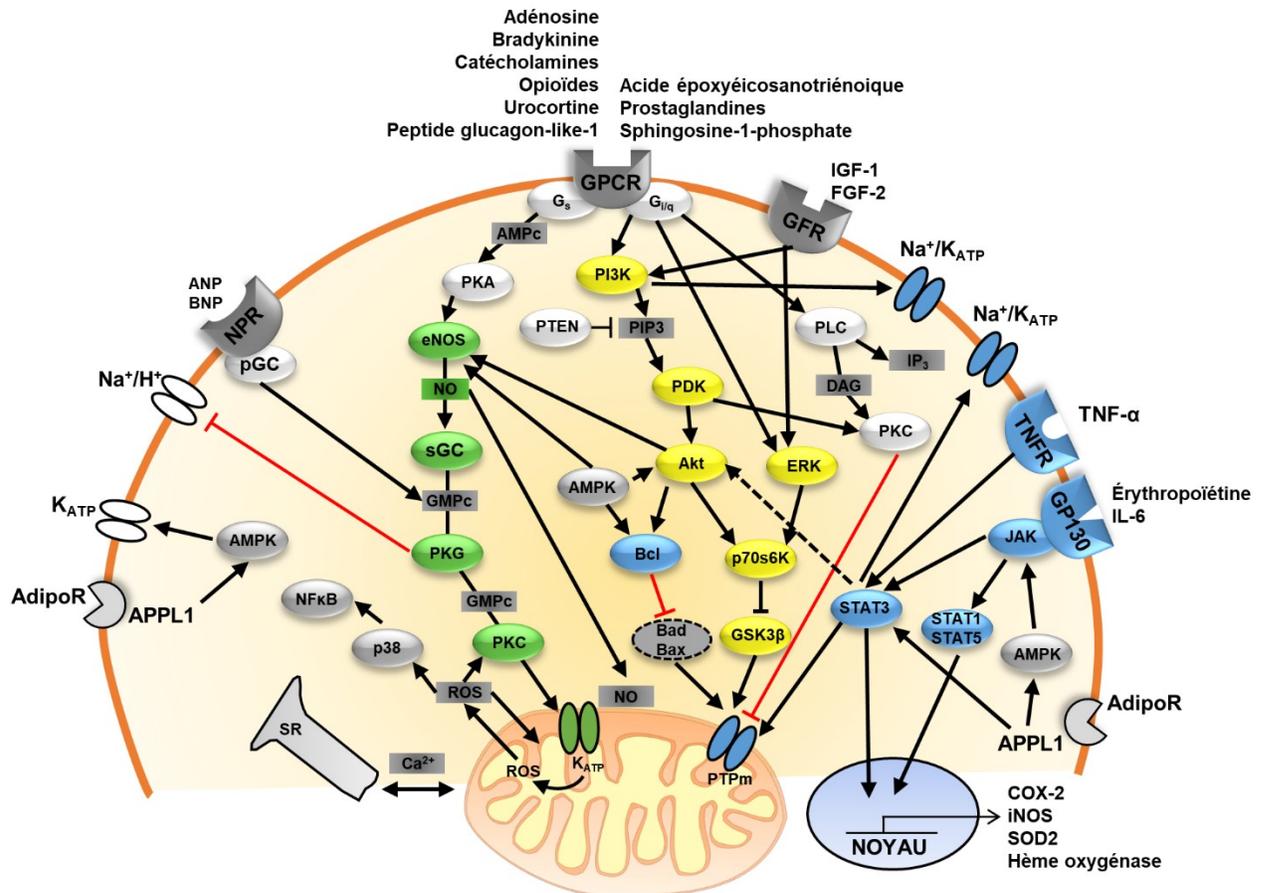
kinase)-STAT3 (*signal transducers and activators of transcription-3*) qui induisent la transcription de gènes de pro-survie. La PKC fait partie de la voie RISK (*reperfusion injury salvage kinase*) et inhibe l'ouverture du PTPm (Sanada et coll., 2011), conduisant à une diminution des arythmies et de la relâche de troponine (Walsh et coll., 2008). Les périodes brèves d'ischémie augmentent l'activité des NOS qui produisent le NO, des enzymes anti-oxydantes qui diminuent le stress oxydatif et des canaux Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases qui éliminent l'accumulation du sodium intracellulaire (Figure 28). Le préconditionnement prépare donc le tissu à tolérer une ischémie qui est caractérisée par des changements au niveau du métabolisme et de l'homéostasie ionique, mais aussi à mieux tolérer une reperfusion qui est caractérisée par la production de ROS, la migration de neutrophiles et l'activation de l'apoptose (Dorweiler et coll., 2007). Toutefois, l'application du préconditionnement ischémique requiert qu'on l'applique avant que l'ischémie ait lieu, et ce, en aval de la zone touchée.

Plus tard, l'équipe de Zhao a montré que le conditionnement ischémique n'est pas restreint qu'au moment précédant l'ischémie. Après 60 min d'ischémie du myocarde, la ré-occlusion de l'artère coronaire antérieure descendante gauche (LAD) avec trois cycles de reperfusion pendant 30 sec (post-conditionnement) a présenté un effet cardioprotecteur en diminuant la taille de l'infarctus de 44% chez le chien (Zhao et coll., 2003).

Une alternative est le conditionnement ischémique éloigné (RIC, *remote ischemic conditioning*) qui consiste à induire des cycles d'ischémie/reperfusion à un site distal de la zone d'infarctus. Une première étude a montré qu'un conditionnement de l'artère circonflexe avec 4 cycles de 5 min d'ischémie/reperfusion suivis de l'occlusion de la LAD pendant 1 heure présentait une taille d'infarctus moins élevée chez le chien (Przyklenk et coll., 1993). Par la suite, des études ont montré que le conditionnement ischémique pouvait avoir lieu sur des organes éloignés tels que les intestins, les reins (Gho et coll., 1996) ou encore le bras (Thielmann et coll., 2013). Le conditionnement ischémique peut avoir lieu avant, pendant ou après une ischémie (Szijarto et coll., 2012).

Les études de ces trois types de conditionnement ischémique ont permis d'étudier les cibles et les voies cardioprotectrices dans la pathologie de l'I/RM. En effet, de courts épisodes

d'ischémie montrent une sécrétion accrue d'autacoïdes, tels que l'adénosine, la bradykinine et les opioïdes, liant des RCPGs. L'activation des RCPGs dans les cardiomyocytes induit la voie de signalisation RISK, qui inclut PI3K, Akt (Bopassa et coll., 2006), eNOS, PKG, PKC, Ras, Raf, MEK (*methyl ethyl ketone*) et ERK1/2 (Hausenloy, 2013). L'activation de ces kinases induit la transcription de gènes anti-apoptotiques, tels que Bcl-2 et Bcl-xL, inhibe les facteurs pro-apoptotiques, tels que Bad et Bax, stimule la capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique, phosphoryle et inhibe la GSK-3 $\alpha/\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 alpha/beta*) et stimule l'ouverture du canal potassique mitochondrial sensible à l'ATP (K<sub>ATP</sub>) (Garlid et coll., 2003; Heusch, 2015). L'ouverture du K<sub>ATP</sub> induit la relâche de ROS dans le cytosol qui activera séquentiellement la MAPK p38 et NF $\kappa$ B. De manière parallèle, le conditionnement stimule aussi la sécrétion de TNF- $\alpha$  et sa liaison avec le TNFR. La production de ROS, l'activation de NF $\kappa$ B et la sécrétion de TNF- $\alpha$  partagent le même paradoxe que le conditionnement ischémique, dans le sens que leur faible induction protège le myocarde, alors qu'une forte induction soutenue est néfaste pour le cœur (Heusch, 2015). L'activation du TNFR peut induire la voie de pro-survie SAFE (*survivor activating factor enhancement*), qui inclut une activation de la cascade JAK/STAT3. La protéine STAT3 phosphorylée et activée ira dans le noyau pour initier la transcription de gènes anti-apoptotiques (Lacerda et coll., 2009). Les voies RISK et SAFE convergent pour inhiber l'ouverture du PTPm qui conduit à la mort cellulaire (Davidson et coll., 2006; Lecour, 2009; Ong et coll., 2015). Les autres effets observés après un conditionnement ischémique lors d'un infarctus du myocarde sont une diminution des arythmies, une préservation de la fonction cardiaque, une diminution de l'inflammation et une protection contre le stress oxydatif (Costa et coll., 2013; Lim et Hausenloy, 2012). Les études sur les voies de signalisation activées par le conditionnement ischémique ont poussé plusieurs groupes de recherche à se concentrer sur des molécules agissant sur ces voies comme cibles pour le traitement de l'IAM.



**Figure 28. Voies de signalisation de RISK et de SAFE dans la cardioprotection**

Les protéines impliquées dans la voie de RISK sont en jaune, les protéines impliquées dans la voie de SAFE sont en bleu, les protéines et molécules impliquées dans la voie de NO/PKG sont en vert. FGF, facteur de croissance des fibroblastes; GFR, récepteur des facteurs de croissance; NPR, récepteur des peptides natriurétiques; PDK, pyruvate déshydrogenase kinase ; PTEN, homologue de phosphatase et tensine; PTPm, pore de transition de perméabilité mitochondriale; SR, réticulum sarcoplasmique. Figure modifiée et traduite de (Heusch, 2015).

### 1.2.3.4 Autres cibles dans la pathologie de l'ischémie/reperfusion du myocarde

#### 1.2.3.4.1 Akt

L'Akt (ou protéine kinase B, PKB) est une sérine/thréonine kinase qui possède des effets cardioprotecteurs en augmentant la survie cellulaire, le métabolisme du glucose et la fonction cardiaque et en stimulant l'angiogenèse (Fernandez-Hernando et coll., 2007; Miyamoto et coll.,

2009; Sussman et coll., 2011; Yao et coll., 2014). En général, l'activation des récepteurs tyrosine-kinases ou RCPGs activent la PI3K. Le domaine SH2 de la sous-unité p85 de la PI3K se lie au récepteur activé, alors que la sous-unité p110 catalyse la phosphorylation de la phosphoinositol 4,5 diphosphate (PIP2) membranaire en phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3). L'Akt et la PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase*) peuvent lier le PIP3 et leur proximité permet à la PDK1 de phosphoryler l'Akt sur les résidus ser473 et Tyr308 (Bononi et coll., 2011).

Il a été mentionné précédemment que l'activation d'Akt conduit à une augmentation de l'entrée du glucose dans les cardiomyocytes en augmentant la translocation de GLUT4 à la membrane sarcolemmique provenant de la réserve de GLUT4 présente dans des vésicules de stockage (section 1.2.1.1). Conséquemment, l'activation d'Akt augmente donc le métabolisme du glucose qui est favorable dans une situation d'I/RM.

Outre les effets anti-apoptotiques de l'Akt sur Bad et Bax (Aikawa et coll., 2000) mentionnés précédemment, l'Akt peut aussi phosphoryler la GSK-3 $\alpha/\beta$ , responsable de la synthèse du glycogène et de la gluconéogenèse, sur la ser9 et causer son inhibition (Zhai et coll., 2011). Des études ont montré que la GSK-3 $\alpha/\beta$  possède aussi des propriétés pro-apoptotiques en stimulant l'ouverture du PTPm (Pap et Cooper, 1998; Park et coll., 2006). L'activation de la voie Akt, inhibant la GSK-3 $\alpha/\beta$  est bien connue dans la voie cardioprotectrice RISK lors du pré-conditionnement ischémique (Mocanu et coll., 2002; Tong et coll., 2002).

L'activation d'Akt peut aussi réduire le stress oxydatif en initiant la transcription de gènes anti-oxydants. Une étude a montré que la voie PI3K/Akt peut stimuler l'activité du facteur de transcription Nrf2 (*E2-related factor 2*), qui se lie sur le ARE (*antioxidant-responsive element*) et cause la transcription d'enzymes anti-oxydantes, telles que l'HO-1 (hème oxygénase), la SOD, la catalase et la GSH-Px (Chen et coll., 2014; Ooi et coll., 2017).

L'activation d'Akt par l'insuline a conduit à la phosphorylation et l'activation d'eNOS. La production de NO par eNOS a un effet vasodilatateur (Ji et coll., 2010) et pro-angiogénique (Bir et coll., 2012). Dans les cellules endothéliales, la PKG stimule la cascade des MAPK (Ras,

Raf, MEK et ERK1/2, séquentiellement) et induit la transcription des gènes impliqués dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales, résultant en l'angiogenèse (Bir et coll., 2012; Fisslthaler et coll., 2003).

Des études ont montré que l'Akt joue un rôle dans le cycle du calcium en phosphorylant le phospholamban (PLB) (Catalucci et coll., 2009; Duan et coll., 2003), un inhibiteur endogène de la SERCA lorsque le PLB est sous la forme déphosphorylée, et augmente l'activité de NCX (Miyamoto et coll., 2005), améliorant ainsi la fonction contractile du myocarde. En effet, la dépolarisation membranaire après l'influx de  $\text{Na}^+$  et l'efflux de  $\text{K}^+$  cause l'ouverture des canaux pour le calcium de type L (CavL). L'augmentation du calcium intracellulaire active le récepteur de la ryanodine (RyR) sur le réticulum sarcoplasmique et conduit à la relâche additionnelle de  $\text{Ca}^{2+}$ . Comme expliqué précédemment, le  $\text{Ca}^{2+}$  lie la troponine C et cause la contraction musculaire. Le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est ensuite diminué, soit par son efflux par le NCX au sarcolemme ou sa réentrée dans le réticulum sarcoplasmique par le SERCA.

#### 1.2.3.4.2 AMPK

L'AMPK est une protéine qui détecte les changements d'énergie intracellulaire. Elle est activée lorsque le ratio ATP/AMP diminue. Lorsque le cœur a besoin d'énergie, l'AMPK est activée et, via la phosphorylation et l'inhibition de l'ACC, augmente la bêta-oxydation; au contraire l'oxydation des acides gras est réduite lorsque le cœur demande peu d'énergie (Horman et coll., 2012). L'AMPK est une protéine hétérotrimérique constituée d'une sous-unité  $\alpha$  catalytique et de sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  régulatrices (Gao et coll., 1996; Woods et coll., 1996). La sous-unité  $\gamma$  est sensible à la présence d'AMP, et sa liaison avec celle-ci permet de rendre accessible, par un changement de conformation, la Thr172 sur la sous-unité catalytique  $\alpha$ , permettant ainsi sa phosphorylation et son activation par la LKB1, qui est hautement exprimée dans les cardiomyocytes, ou par la CAMKK $\beta$  (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$* ), qui est hautement exprimée dans les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales mais faiblement exprimée dans les cardiomyocytes (Dyck et Lopaschuk, 2006; Horman et coll., 2012).

De manière similaire à l'Akt, l'AMPK augmente aussi l'entrée du glucose et des acides gras telle que décrite dans la section 1.1.2.1.. Pour ce faire, l'AMPK phosphoryle la PFK2 qui produit le fructose-2,6-biphosphate qui, à son tour, active la PFK1, favorisant ainsi la glycolyse (Marsin et coll., 2000), alors que la phosphorylation de l'ACC2 favorise l'oxydation des acides gras (Kudo et coll., 1995). Donc, l'activation de l'AMPK augmente l'entrée et l'oxydation du glucose et d'acides gras dans le cœur. On pourrait penser que, dans une situation d'I/RM, l'activation de la bêta-oxydation inhibe l'oxydation du glucose et cause son découplage avec la glycolyse et l'oxydation du pyruvate. Quoiqu'une activation trop importante de l'AMPK pourrait causer des dommages plus importants aux cellules (Dyck et Lopaschuk, 2006; Horman et coll., 2012), des études avec des souris déficientes en AMPK ont montré que pendant l'ischémie, l'entrée du glucose et la glycolyse étaient grandement diminuées. Les résultats ont montré une plus grande taille de l'infarctus et des hypercontractures plus sévères, bien que la stimulation de l'oxydation des acides gras était absente à la reperfusion (Carvajal et coll., 2007; Russell et coll., 2004; Xing et coll., 2003). Ces études ont montré que les effets cardioprotecteurs de l'AMPK dans l'I/RM sont à privilégier malgré les effets potentiellement néfastes de l'AMPK pouvant potentiellement augmenter les dommages tissulaires. De plus, l'utilisation d'un agent pharmacologique activant l'AMPK appuie ces résultats (Kim et coll., 2011).

L'AMPK augmente non seulement le métabolisme, mais inhibe aussi les voies qui consomment de l'énergie, telles la prolifération et la synthèse de protéines (Chan et coll., 2004; Hardie et Carling, 1997). L'activation de l'AMPK phosphoryle et active la TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), un inhibiteur du complexe mTORC1 (*mTOR (mammalian target of rapamycin) complex 1*), et phosphoryle et inactive la protéine Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) sur le complexe mTORC1. Le complexe mTORC1 active à la fois la p70S6K (*p70 ribosomal S6 protein kinase*), qui induit la transcription de protéines ribosomales et de facteurs d'élongation, et la 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor-4E binding protein-1*), qui initie la traduction des protéines (Gwinn et coll., 2008; Inoki et coll., 2003). Cette régulation permet à la cellule de dépenser son énergie dans les voies qui lui sont le plus utiles pour sa survie. Après l'I/RM, des dommages trop importants peuvent conduire à une hypertrophie adaptative du myocarde, mais si le stress myocardique perdure trop longtemps, l'hypertrophie peut devenir mésadaptée et progresser vers le remodelage pathologique, la dysfonction et la défaillance

cardiaque. L'inhibition de la synthèse des protéines par l'activation de l'AMPK réduit le développement de l'hypertrophie du myocarde (Chan et coll., 2008; Chan et coll., 2004).

L'AMPK, comme l'Akt, promeut la vasodilatation. En effet, l'AMPK peut également phosphoryler eNOS, stimuler la production de NO dans les cellules endothéliales (Bir et coll., 2012; Thors et coll., 2004) et phosphoryler le PLB pour initier la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (Schneider et coll., 2015).

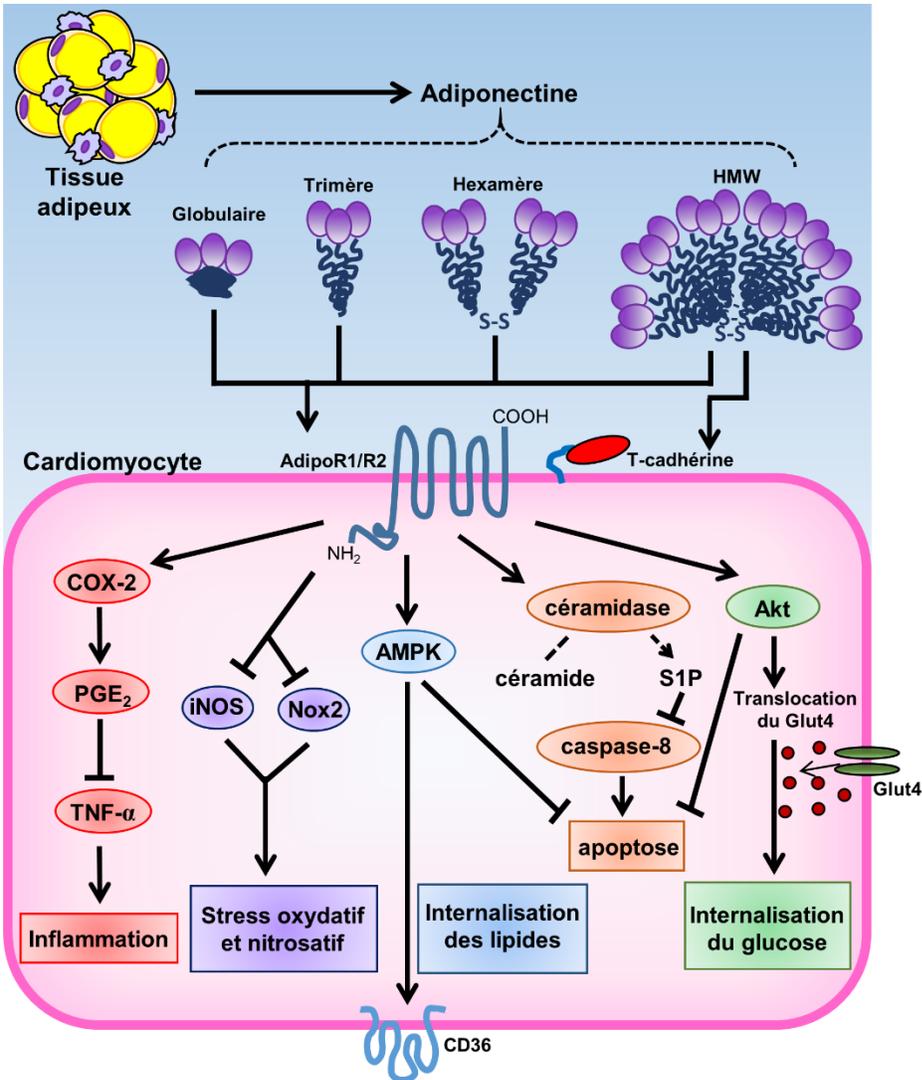
#### **1.2.3.4.3 Adiponectine**

L'adiponectine est une adipokine majoritairement sécrétée par le tissu adipeux. Toutefois, des études ont montré que l'adiponectine est aussi produite et sécrétée par les cardiomyocytes, suggérant alors que ses effets cardioprotecteurs peuvent être de nature autocrine et paracrine (Skurk et coll., 2008; Wang et coll., 2010). Des études ont aussi montré l'expression du gène de l'adiponectine dans les hépatocytes (Yoda-Murakami et coll., 2001), le muscle squelettique (Liu et coll., 2009), les ostéoblastes (Shinoda et coll., 2006) et le placenta (Caminos et coll., 2005). La synthèse d'adiponectine cardiaque et l'expression des récepteurs AdipoR1 (*adiponectin receptor 1*) et AdipoR2 sont stimulées après l'activation de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone (Ding et coll., 2007). L'adiponectine peut lier ses récepteurs, l'adipoR1 et l'adipoR2, qui présentent 7 domaines transmembranaires distincts des RCPGs. En effet, à l'opposé des RCPGs, la liaison de l'adiponectine se fait sur le domaine C-terminal du récepteur qui est extracellulaire, tandis que le domaine N-terminal est cytoplasmique et interagit avec une protéine adaptatrice, l'APPL1 (*adaptor protein phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1*). L'adipoR1 est fortement exprimé dans les cellules endothéliales et les muscles squelettique et cardiaque, tandis que l'adipoR2 est plus exprimé au niveau du foie. Le muscle cardiaque exprime aussi la T-cadhérine, capable de lier l'adiponectine et de permettre son interaction avec les cardiomyocytes (Denzel et coll., 2010).

On observe une diminution de la concentration circulante d'adiponectine chez les patients qui ont subi un IAM (Kumada et coll., 2003; Zhu et coll., 2008), tandis que sa concentration élevée en circulation prédit un risque plus faible de subir un IAM chez les patients

atteints de maladies cardiovasculaires (Pischon et coll., 2004). Les souris déficientes en adiponectine présentent des lésions plus sévères après une ischémie/reperfusion du myocarde (Tao et coll., 2007) et sont plus susceptibles de développer une hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression dans un modèle de constriction transaortique (Shibata et coll., 2005), alors que ces effets ont été inversés suite au traitement avec un adénovirus stimulant l'expression d'une adiponectine recombinante (Shinmura et coll., 2007).

L'adiponectine protège le myocarde contre les dommages induits après un IAM en activant l'Akt (Skurk et coll., 2008), l'AMPK (Shibata et coll., 2005; Wang et coll., 2009) et la céramidase (Holland et coll., 2011), ce qui aura comme effet d'augmenter l'oxydation du glucose et des acides gras et de diminuer l'apoptose (Tao et coll., 2007). En effet, la forte concentration cellulaire en palmitate conduit à la synthèse de céramide, un activateur de la caspase-3 (Park et coll., 2011) et de la caspase-8 (Tirodkar et Voelkel-Johnson, 2012). La céramidase est une enzyme qui désacyle la céramide pour produire la sphingosine-1-phosphate (S1P) qui possède des propriétés anti-apoptotiques par l'inhibition de la caspase-8 (Holland et coll., 2011). L'adiponectine protège aussi le cœur suite à un IAM en diminuant le stress causé par la production d'oxydants et de nitrites. L'administration d'adiponectine à des souris ayant subi une I/RM a diminué l'expression protéique d'iNOS et de la gp91phox (ou NOX2) dans l'homogénat de cœur (Wang et coll., 2009). Les effets anti-inflammatoires de l'adiponectine suite à un IAM sont liés à l'activation de COX-2 dans le myocarde, causant la production de prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) et de l'inhibition de la production excessive de TNF- $\alpha$  (figure 29) (Salvado et coll., 2009; Shibata et coll., 2005). Dans les macrophages, l'adiponectine diminue aussi la relâche de TNF- $\alpha$  en inhibant NF $\kappa$ B (Ouchi et coll., 2001), stimule leur polarisation vers leur forme M2 anti-inflammatoire (Lovren et coll., 2010; Ohashi et coll., 2010), et augmente la production d'IL-10 (Kumada et coll., 2004).



**Figure 29. Voies de signalisation cardioprotectrices de l'adiponectine**

APPL1, *adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1*; COX-2, *cyclooxygénase-2*; HMW, *high molecular weight*; iNOS, *inducible nitric oxyde synthase*; S1P, *sphingosine-1-phosphate*; TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor-alpha*. Figure modifiée et traduite de (Xu et Vanhoutte, 2012).

Bien que le tissu adipeux soit le principal organe à sécréter l'adiponectine en circulation, l'adiponectine est aussi exprimée au niveau des cardiomyocytes humains (Skurk et coll., 2008), de rats et de souris (Amin et coll., 2010; Amin et coll., 2010; Ding et coll., 2007). À ce niveau, l'adiponectine peut conférer ses effets cardioprotecteurs à travers des actions autocrine et paracrine, en plus de son action endocrine (Wang et coll., 2010).

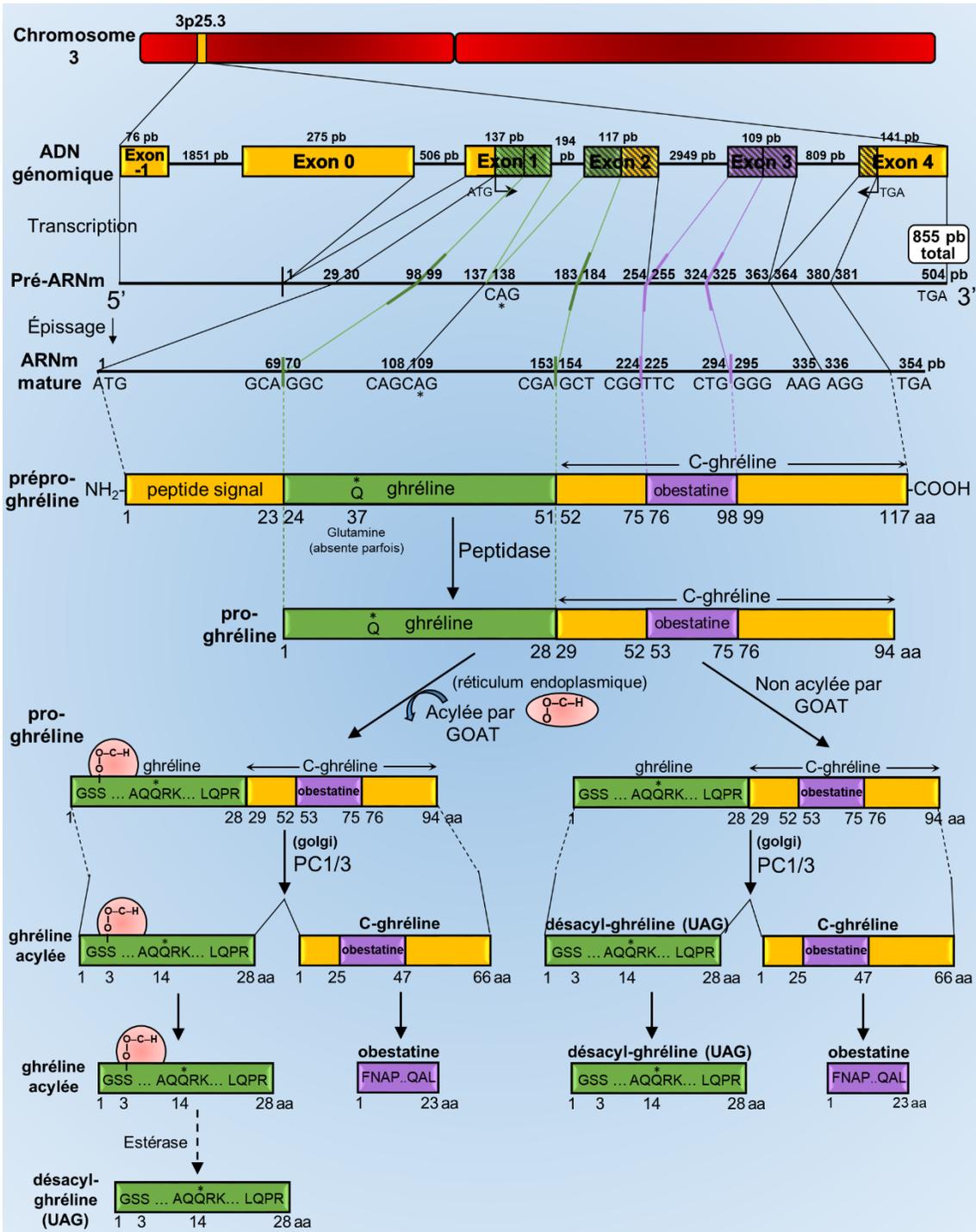
## 1.3 La ghréline et sa forme désacylée

L'étude des effets cardioprotecteurs des sécrétagogues de l'hormone de croissance s'est étendue à la ghréline et ses dérivés, étant le ligand endogène du récepteur des GHRPs synthétiques. Cette section décrit donc le système de la ghréline et de sa forme désacylée, l'UAG. Puisqu'il existe une immense littérature sur la ghréline et son récepteur, le récepteur de la ghréline, en comparaison à celle de l'UAG, cette section décrira la ghréline et son récepteur pour mettre en contraste et en valeur l'UAG.

### 1.3.1 Expression du gène de la ghréline

Le gène humain de la ghréline (*GHRL*) est situé dans la région du chromosome 3p25.3 (3p25-26) (Gueorguiev et Korbonits, 2013). Initialement, quatre exons codants pour le *GHRL* ont été identifiés (Tanaka et coll., 2001), mais des études subséquentes ont mené à la découverte de d'autres exons en aval. Le *GHRL* comprend donc six exons, dont quatre codants, cinq introns et au moins 15 variants d'ARNm par épissage alternatif (Seim et coll., 2007). Parmi ceux-ci, cinq variants d'ARNm matures codent tous pour la même protéine, la prépro-ghréline, composée de 117 aa (figure 30) qui représente le variant exprimé au niveau de l'estomac et du cœur, et présente 84% d'homologie avec la séquence murine (Tanaka et coll., 2001). La prépro-ghréline possède une séquence de 23 aa située du côté N-terminal codant pour le peptide signal lui permettant d'être acheminée vers le réticulum endoplasmique, suivie d'une séquence de 28 aa codant le peptide de la ghréline et d'une séquence de 66 aa codant pour la C-ghréline (appelée ainsi parce qu'elle est située du côté C-terminal), qui contient la séquence de l'obestatine d'une longueur de 23 aa. Une fois que le peptide signal est clivé par une peptidase, la pro-ghréline peut alors être acylée au niveau de la sérine en position 3 par l'ajout d'un groupement n-octanoyl dans le réticulum endoplasmique par l'enzyme O-acyltransférase de la ghréline (GOAT, *ghrelin O-acyltransferase*). Bien que la GOAT ajoute un groupement d'acide gras qui peut varier en longueur de 2 à 14 carbones (Gutierrez et coll., 2008), chez l'humain on retrouve principalement la ghréline sous forme n-octanoyle, puis en deuxième lieu n-décanoyle (Hosoda et coll., 2003), qui sont en fait les deux formes optimales pour lier le récepteur de la ghréline (Muller et coll.,

2015). Finalement, la ghréline est clivée de la C-ghréline par la convertase de prohormone 1/3 (PC1/3, *prohormone convertase 1/3*) pour donner la ghréline acylée, tandis que la C-ghréline subit d'autres modifications post-traductionnelles pour donner l'obestatine. Bien que l'UAG représente la forme majoritaire dans la circulation (Patterson et coll., 2005), il n'est pas encore démontré si elle provient seulement d'une désacylation de la ghréline acylée ou s'il y aurait aussi une synthèse de ghréline non-acylée (Nishi et coll., 2011). Parmi les variants d'ARNm, on peut observer des variations mineures de la séquence peptidique, comme par exemple l'exclusion de l'aa glutamine (Gln) en position 14 de la ghréline, conduisant à un peptide de 27 aa appelé des-Gln<sup>14</sup>-ghréline, qui garde toutefois sa capacité à lier le récepteur de la ghréline (Hosoda et coll., 2000). Par contre, on peut retrouver des variations majeures, allant de l'exclusion de l'exon 1, à l'exclusion totale des exons 1 et 2 qui codent pour le peptide de la ghréline (Seim et coll., 2007).



**Figure 30. Structure du gène de la ghréline chez l'homme et étapes de la synthèse de la ghréline**

GOAT, *ghrelin O-acyltransferase*; PC1/3, prohormone convertase 1/3. Figure inspirée et traduite de (Au et coll., 2016; Lim et coll., 2011).

### 1.3.2 Structure de la ghréline

La ghréline est unique en son genre, puisque c'est le premier peptide découvert et le seul connu à posséder un acide octanoïque dans sa structure (Kojima et Kangawa, 2008). Le groupement acyl de la ghréline lui permet d'interagir favorablement avec la membrane cellulaire afin d'augmenter la concentration locale de ghréline à proximité du récepteur de la ghréline et d'optimiser sa liaison dans la poche du récepteur de la ghréline (Staes et coll., 2010).

La synthèse de fragments peptidiques dérivés de la ghréline a permis de démontrer que la structure minimale de la ghréline lui permettant de lier son récepteur, le récepteur de la ghréline, est la présence de ses quatre premiers aa, incluant l'acylation sur la sérine en position 3 (Bednarek et coll., 2000) (figure 31). Ce térapeptide peut produire 90% de la réponse maximale de la ghréline (en mesurant la relâche de calcium intracellulaire *in vitro*), mais à une concentration efficace médiane (CE<sub>50</sub>) deux fois plus élevée (72 nM vs. 32 nM). Par contre, le pentapeptide constitué des 5 premiers aa peut produire 96% de la réponse de la ghréline et possède une CE<sub>50</sub> deux fois plus faible (11,5 nM vs. 32 nM) (Bednarek et coll., 2000).



**Figure 31. Structure de la ghréline**

La ghréline est acylée sur la sérine en position 3. Les quatre premiers acides aminés (vert), ainsi que le cinquième (vert pâle) sont importants pour sa liaison au récepteur de la ghréline. Figure inspirée de (Muller et coll., 2015).

### 1.3.3 Expression protéique de la ghréline

Près du deux tiers de la ghréline sécrétée en circulation est produite par les cellules endocriniennes P/D1 (ou cellules de la ghréline) retrouvées dans la muqueuse oxyntique de

l'estomac (Date et coll., 2000). Les cellules de la ghréline représentent 20% des cellules endocriniennes de la muqueuse oxyntique et sont de type fermé, ce qui signifie que leur côté apical est entouré de cellules épithéliales et qu'elles ne sont pas en contact avec la lumière de l'estomac. Le reste de la ghréline est produit par les cellules de la ghréline situées dans l'intestin grêle et le colon, où l'on peut les retrouver à la fois de type fermé, ou de type ouvert vers la lumière de l'intestin (Sakata et Sakai, 2010). Les cellules de la ghréline sont moins nombreuses au fur et à mesure qu'on s'éloigne de l'estomac (Date et coll., 2000; Sakata et coll., 2002). La ghréline est aussi retrouvée en plus petite quantité au niveau de l'hypophyse (Guan et coll., 1997; Korbonits et coll., 2001), de l'hypothalamus (Howard et coll., 1996; Korbonits et coll., 2001), de la glande thyroïdienne (Kanamoto et coll., 2001), des poumons (Volante et coll., 2002), du pancréas (Date et coll., 2002; Guan et coll., 1997; Wierup et coll., 2004), des reins (Dagli et coll., 2009; Mori et coll., 2000), des ovaires (Gnanapavan et coll., 2002; Tena-Sempere et coll., 2002), des testicules (Gnanapavan et coll., 2002; Tena-Sempere et coll., 2002), des os (Fukushima et coll., 2005), des tissus lymphatiques (Gnanapavan et coll., 2002), des cellules endothéliales de la micro- et macrovasculature (Kleinz et coll., 2006) et du cœur (Gnanapavan et coll., 2002; Iglesias et coll., 2004). La ghréline est aussi retrouvée en circulation, où elle serait transportée par les lipoprotéines. En effet, le groupement acyl de la ghréline permettrait son interaction avec les chylomicrons, les VLDL et les LDL, tandis que les séquences en N- et C-terminales permettraient son interaction avec les HDL (Beaumont et coll., 2003; De Vriese et coll., 2007). Au contraire, l'UAG qui ne possède pas de groupement acyl circule librement dans le sang (De Vriese et coll., 2007). La ghréline possède une courte demi-vie (9 à 11 min) (Tong et coll., 2013) en comparaison à celle de l'UAG (32-39 min) (Tong et coll., 2013), ce qui pourrait être expliquée en partie par le fait que la ghréline est déacylée en circulation par des enzymes telles que la butyrylcholinestérase et l'acétylhydrolase (De Vriese et coll., 2007). On retrouve en circulation environ 10-20 fmol/mL de ghréline acylée sur un total de 100-150 fmol/mL de ghréline acylée et désacylée. La forme de l'UAG représente donc 90% de la ghréline totale (acylée et désacylée) circulante (Kojima et Kangawa, 2005).

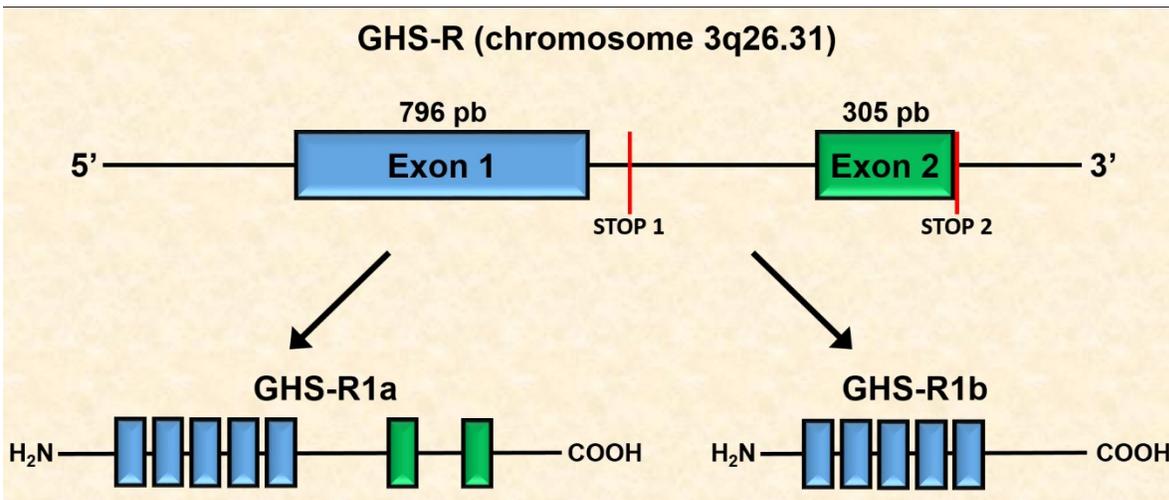
### 1.3.4 Régulation de la sécrétion de la ghréline

Les concentrations de ghréline acylée en circulation et de la GOAT dans les cellules sont augmentées en état de jeûne (An et coll., 2010; Xu et coll., 2009) et diminuées en état post-prandial (Cummings et coll., 2001; Tschop et coll., 2001). Au contraire, la concentration de l'UAG en circulation est plus élevée en état post-prandial et plus faible en état de jeûne. En période de jeûne, l'activation du système nerveux sympathique conduisant à la relâche d'adrénaline, de noradrénaline et du peptide relié au gène calcitonine (PRGC), et à la relâche d'hormones endocriniennes telles que la sécrétine, la mélanocortine et le glucagon, induisent la sécrétion de la ghréline au niveau de l'estomac (de la Cour et coll., 2007). En effet, les cellules de la ghréline dans l'estomac expriment entre autres le récepteur  $\beta$ 1-adrénergique qui, lorsqu'activé par la noradrénaline, induit une augmentation d'AMPc qui viendra activer la PKA par l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et induire la sécrétion de ghréline dans des granules (Gagnon et Anini, 2012). Les cellules oxyntiques expriment aussi le récepteur du glucagon (GluR) dont la liaison du glucagon cause une augmentation d'AMPc intracellulaire et une activation de ERK1/2, ce qui conduit à une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la sécrétion de la ghréline (Gagnon et Anini, 2013).

Après la prise alimentaire, la présence des nutriments et/ou de leurs métabolites et la sécrétion d'hormones gastro-intestinales telles que la somatostatine et la bombésine (ou *gastrin releasing peptide*) durant la digestion des nutriments (de la Cour et coll., 2007) et la relâche d'insuline lors de la digestion des nutriments inhibent la sécrétion de la ghréline (Kamegai et coll., 2004). Les cellules sécrétant la ghréline expriment le récepteur à l'insuline (INSR) et la liaison de l'insuline active l'Akt en induisant sa phosphorylation et diminue la concentration d'AMPc, inhibant ainsi la sécrétion de la ghréline (Gagnon et Anini, 2012). Il est intéressant de noter que les acides gras, comme les triglycérides à chaîne longue et les phospholipides, ont un effet inhibiteur moindre sur la sécrétion de la ghréline, comparativement aux protéines et aux hydrates de carbone (Overduin et coll., 2005). Ceci pourrait expliquer en partie la prise de poids plus importante lors d'une diète riche en lipides puisque l'effet de satiété est atteint moins rapidement avec les acides gras puisque la ghréline circulante est diminuée moins rapidement avec ceux-ci.

### 1.3.5 Récepteur de la ghréline

Le gène du récepteur de la ghréline, le GHS-R, est localisé sur le chromosome 3q26.31 et consiste en deux exons séparés par un intron codant pour un RCPG à sept domaines transmembranaires (Howard et coll., 1996). L'exon 1 encode pour les régions transmembranaires I à V, tandis que l'exon 2 encode pour les régions transmembranaires VI et VII. Par épissage alternatif, le gène du GHS-R encode pour 2 ARNm distincts, le récepteur de la ghréline (initialement appelé GHS-R1a) et le GHS-R1b (figure 32). Il a été montré que le GHS-R1b peut former un hétérodimère avec le récepteur de la ghréline (Leung et coll., 2007) et restreindre le changement de conformation du récepteur de la ghréline suite à la liaison de son ligand, ce qui l'empêche d'activer la protéine  $G_{q/11}$ , inhibant ainsi son activité constitutive (Chu et coll., 2007; Leung et coll., 2007). De plus, la forte expression du GHS-R1b dans le réticulum endoplasmique empêche la translocation du GHS-R1a à la membrane plasmique ce qui réduit son activité (Chow et coll., 2012). D'un autre côté, le récepteur de l'UAG reste à ce jour non-identifié.

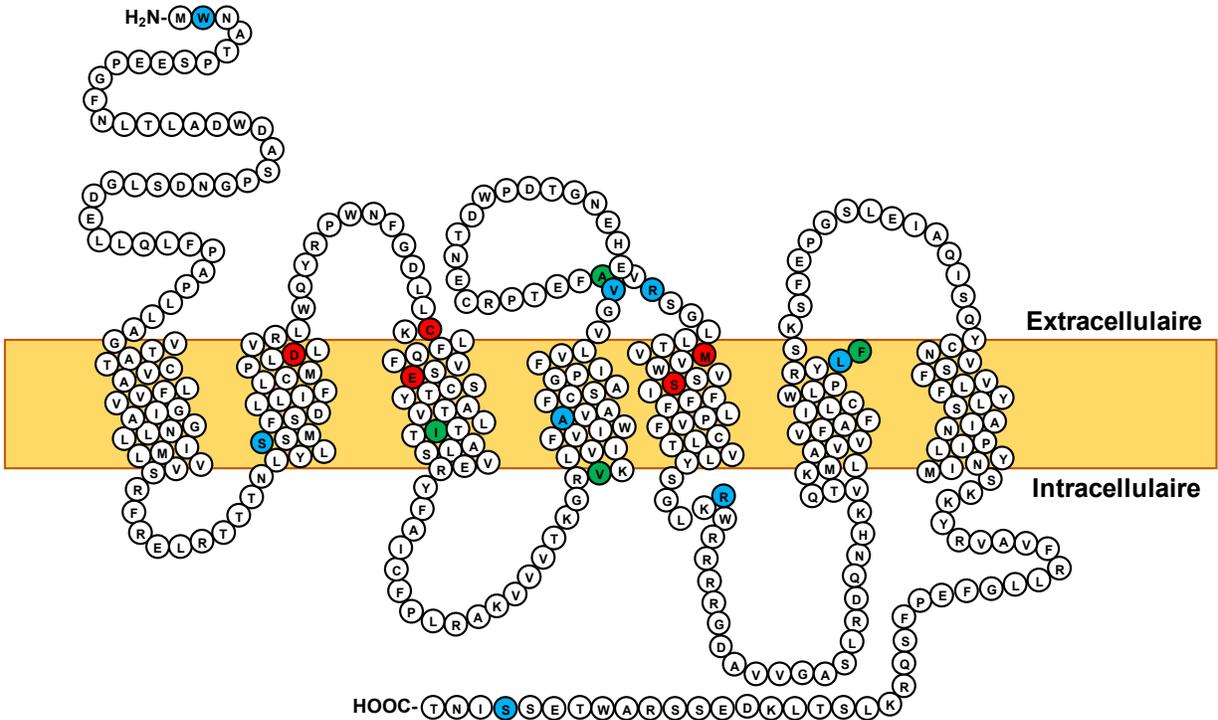


**Figure 32. Structure du gène du GHS-R**

Le GSH-R code pour deux récepteurs, le récepteur de la ghréline à sept passages transmembranaires et le GHS-R1b à 5 passages transmembranaires, obtenus par épissage alternatif. Figure inspirée et traduite de (Gil-Campos et coll., 2006; Liu et coll., 2011).

### **1.3.5.1 Le récepteur de la ghréline**

L'ARNm du récepteur de la ghréline est composé des exons 1 et 2, qui sera ensuite traduit en un récepteur de 366 aa à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G (Howard et coll., 1996). Le récepteur de la ghréline possède une homologie de séquence avec les récepteurs de la motiline (MLNR ou GPR38, 52%) (Feighner et coll., 1999), de la neurotensine (NTSR, 36%) (Vincent et coll., 1999), de la neuromédine U (NMUR, 33%) (Howard et coll., 2000; Kojima et coll., 2000) et du GPR39, un récepteur orphelin (30%) (Tan et coll., 1998). Il s'agit donc d'une sous-famille de récepteurs dont les ligands endogènes sont des peptides gastro-intestinaux ou neuronaux.

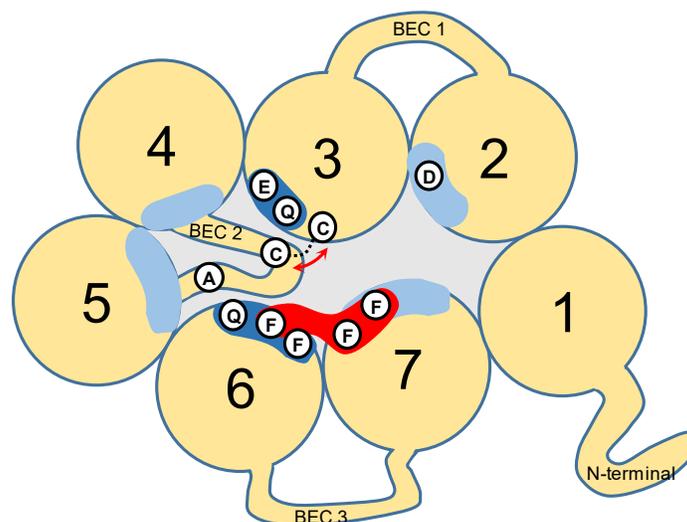


**Figure 33. Structure du récepteur de la ghréline**

L'exon 1 du gène du récepteur de la ghréline code pour la région allant de la queue N-terminale jusqu'au 5<sup>ème</sup> domaine transmembranaire et l'exon 2 code pour le reste du récepteur. En bleu, les sites de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) possible de la ghréline ; en rouge, les aa impliqués de manière importante dans la liaison du GHRP-6 et son activation du récepteur de la ghréline; en vert, les aa responsables de l'activité constitutive du récepteur de la ghréline. Figure inspirée et traduite de (Liu et coll., 2011).

Les aa Asp99 (acide aspartique), Cys116 (cystéine), Glu124 (acide glutamique), Met213, Ser217 et His280 jouent un rôle crucial dans l'activation du récepteur de la ghréline et, en particulier, les aa Met213, Ser217 et His280 sont importants pour la liaison du GHRP-6 au récepteur (Feighner et coll., 1998). En revanche, les aa Ile134 (isoleucine), Val160 (valine), Ala204 et Phe279 sont importants pour son activité constitutive (Holst et coll., 2004; Liu et coll., 2007) (figure 33). Les aa aromatiques Phe279, Phe309 et Phe312 interagissent pour stabiliser la conformation active du récepteur de la ghréline en absence de ligand (Holst et coll., 2004; Mokrosinski et Holst, 2010). De plus, l'interaction entre les aa aromatiques Trp276 et la Phe221 est responsable de la haute activité basale du récepteur de la ghréline (Floquet et coll.,

2010; Schwartz et coll., 2006). En ce qui concerne la liaison de la ghréline au récepteur de la ghréline, les aa Glu124, Gln120, Phe169, Arg173 et Asn305 sont importants pour l'ancrage de la ghréline dans la poche de liaison du récepteur de la ghréline (figure 34) (Holst et coll., 2006).



**Figure 34. Sites clés de l'activation par des agonistes et de l'activation constitutive du récepteur de la ghréline**

La zone bleue foncée constitue les sites de liaison pour la ghréline et les zones bleu pâle ceux des interactions avec les agonistes, en particulier les agonistes non-peptidiques. La zone rouge, quant à elle, représente la poche, bordée d'aa aromatiques, déterminant l'activité constitutive. BEC, boucle extracellulaire. Figure inspirée et traduite de (Callaghan et Furness, 2014).

### 1.3.5.2 Expression du récepteur de la ghréline

Le récepteur de la ghréline est exprimé principalement au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse antérieure (Gnanapavan et coll., 2002; Ueberberg et coll., 2009). On le retrouve aussi au niveau des reins (Gnanapavan et coll., 2002), de la rate (Gnanapavan et coll., 2002), du pancréas (Gnanapavan et coll., 2002; Ueberberg et coll., 2009), du foie (Papotti et coll., 2000), des poumons (Papotti et coll., 2000), de la thyroïde (Gnanapavan et coll., 2002; Ueberberg et coll., 2009), de l'aorte (Rodriguez et coll., 2008), des cellules immunitaires, telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes T et B (Bishop et coll., 2014;

Laviano et coll., 2012), des nodules lymphatiques (Papotti et coll., 2000), du tissu adipeux (Papotti et coll., 2000) et du cœur (Gnanapavan et coll., 2002).

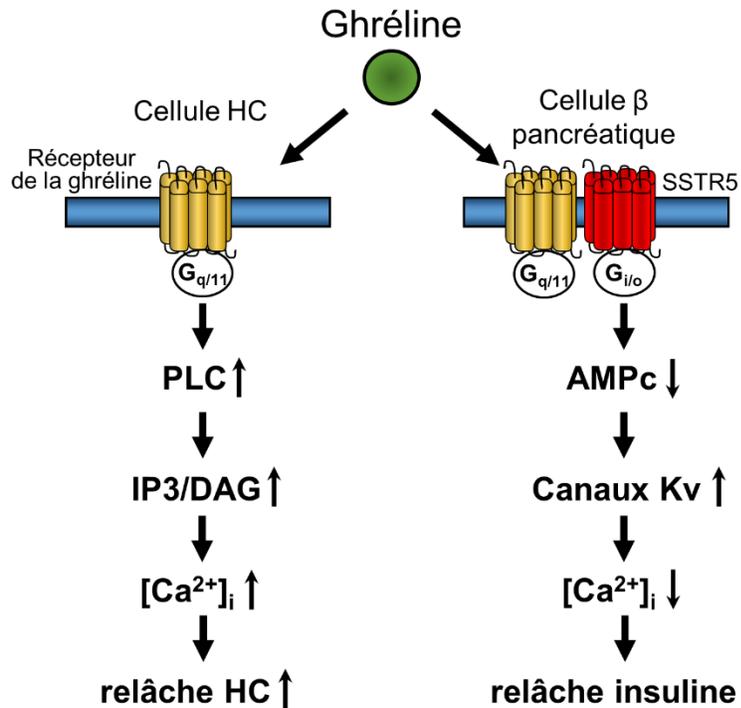
L'expression du récepteur de la ghréline est régulée par un rétrocontrôle négatif, puisque la liaison de la ghréline au récepteur de la ghréline cause une diminution de l'expression de son ARNm (Luque et coll., 2004; Yin et coll., 2014). De plus, il a été observé que le récepteur de la ghréline peut être désensibilisé, comme bien d'autres RCPGs. La stimulation des RCPGs recrute les kinases des RCPGs (GRK, *G protein-coupled receptor kinase*) qui causent la phosphorylation du RCPG sur des résidus cytoplasmiques (Ser<sup>362</sup>, Ser<sup>363</sup> et Thr<sup>366</sup> pour le récepteur de la ghréline (Bouzo-Lorenzo et coll., 2016). La  $\beta$ -arrestine est un effecteur qui vient se lier sur ces sites phosphorylés et empêche l'interaction du RCPG avec ses sous-unités (Smith et Rajagopal, 2016). Cette désensibilisation peut se produire en quelques minutes ou même en quelques secondes (Black et coll., 2016). La liaison de la  $\beta$ -arrestine peut aussi induire l'internalisation du RCPG dans des vésicules de clathrine pour retourner tranquillement à la surface cellulaire pour être recyclé. L'interaction de la  $\beta$ -arrestine avec l'ubiquitine peut mener à la dégradation du RCPG dans les lysosomes. Le récepteur de la ghréline est sujet à toutes ces régulations (Camina et coll., 2004; Holliday et coll., 2007; Tolle et coll., 2001).

### **1.3.5.3 Voies de signalisation du récepteur de la ghréline**

L'activation du récepteur de la ghréline engendre la voie de signalisation typique des RCPGs de type  $G_{q/11}$ . La transfection de cellules COS-7 et HEK-293 avec le récepteur de la ghréline a permis d'identifier la voie de signalisation menant à la sécrétion des HC dans les cellules hypophysaires (Holst et coll., 2006). La stimulation du récepteur de la ghréline induit la dissociation de la sous-unité alpha du complexe de la protéine G, qui ira activer la phospholipase  $C\beta$  qui clivera le lipide membranaire PIP2 en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). L'IP3 ira lier son récepteur (IP3R) au niveau du réticulum endoplasmique et induira la relâche de calcium dans le cytosol. Le calcium ira se lier à la PKC dans le cytosol, qui ira rapidement se lier à la DAG au niveau de la membrane plasmique. La DAG est alors active et conduira à deux actions. La première action consiste à l'inhibition de l'ouverture des canaux potassiques, ce qui empêche la repolarisation membranaire et une

ouverture des canaux calciques de type L et ainsi en une accumulation additionnelle de calcium dans le cytosol pour activer davantage de PKC (Violin et coll., 2003). La deuxième action est la phosphorylation et l'activation de la voie des MAPK et de ERK1/2 qui conduira à la relâche d'hormones de croissance (Stievenard et coll., 2017).

Au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques, le récepteur de la ghréline peut stimuler la sécrétion d'insuline après l'activation de la protéine  $G_q$  (Park et coll., 2012). Toutefois, son hétérodimérisation avec le récepteur de la somatostatine de type 5 (SSTR5) active plutôt la protéine  $G_{i/o}$  après la liaison de la ghréline, ce qui conduit à la fois à une stimulation de l'ouverture des canaux potassiques et de l'inhibition de l'adénylate cyclase. Il s'ensuit une diminution des concentrations intracellulaire d'AMPc, une réduction de l'activation de la PKA, une stimulation moindre de l'ouverture des canaux calciques de type L et une accumulation moindre de calcium intracellulaire. Ces événements conduits à l'inhibition de la sécrétion de l'insuline (Figure 35) (Park et coll., 2012). Le nombre d'hétérodimères est proportionnel au niveau d'expression du récepteur de la ghréline qui est augmenté avant la prise alimentaire et diminué dans l'état post-prandial (Cummings et coll., 2001; Tschop et coll., 2001).



**Figure 35. Différentes voies de signalisation activées par la ghréline**

AMPc, adénosine monophosphate cyclique; cellule HC, cellule somatotrope hypophysaire; DAG, diacylglycérol; HC, hormone de croissance; IP3, inositol triphosphate; PLC, phospholipase C. Figure modifiée et traduite de (Dezaki, 2013).

Le récepteur de la ghréline peut former un hétérodimère avec plusieurs autres récepteurs à sept passages transmembranaires et cela affectera ses fonctions. Par exemple, l'hétérodimérisation du récepteur de la ghréline avec les récepteurs de la dopamine D1 (DRD1) ou D2 (DRD2) (Kern et coll., 2012), de la sérotonine (Currie et coll., 2010; Schellekens et coll., 2015) ou de la mélanocortine de type 3 (MC3) (Rediger et coll., 2011), ou avec le GRP83 (Müller et coll., 2013), aura comme effet de diminuer l'activité constitutive du récepteur de la ghréline et d'atténuer son effet orexigène. Des études ont montré que la liaison de la ghréline sur l'hétérodimère récepteur de la ghréline/DRD1 au niveau de l'hypothalamus active la protéine  $G_{\alpha i}$  du récepteur de la ghréline et amplifie l'activité du DRD1 couplé à la protéine  $G_s$  (Jiang et coll., 2006).

#### 1.3.5.4 Ghrelin receptor-like receptors

Une étude sur la lignée cellulaire de cardiomyocytes H9c2 et les cellules endothéliales d'aortes de porcs (PAOEC, *porcine aortic endothelial cells*) qui n'expriment pas le récepteur de la ghréline, a montré que la ghréline et l'UAG activaient tous les deux la voie PI3K/Akt et ERK1/2 et inhibaient par conséquent l'apoptose (Baldanzi et coll., 2002). L'étude de compétition a révélé que la liaison de la ghréline et de l'UAG radiomarquées sur ce récepteur peut être déplacée par la ghréline et l'UAG non-marquées avec des affinités très similaires (Baldanzi et coll., 2002). Ces récepteurs, non-identifiés à ce jour, ont été appelés les *ghrelin receptor-like receptors* (GRLRs) (Callaghan et Furness, 2014) et sont distincts du récepteur de l'UAG (inconnu à ce jour) qui possède une forte affinité pour l'UAG comparativement à la ghréline. Lors de sa découverte, l'équipe de Kojima n'a pas détecté d'activation du récepteur de la ghréline par l'UAG (Kojima et coll., 1999). Toutefois, des études ultérieures ont montré que l'UAG peut lier le récepteur de la ghréline avec une affinité de plus de 1000 fois moindre que la ghréline. Une étude sur les cellules CHO-K1, exprimant le récepteur de la ghréline humain et l'aéuorine, a montré que l'UAG posséderait une  $CE_{50}$  entre 1,6 et 3  $\mu$ M, comparativement à 2,0 à 2,6 nM pour la ghréline envers le récepteur de la ghréline en mesurant la relâche de calcium intracellulaire (Callaghan et coll., 2014; Gaunavan de Zande et coll., 2007). De plus, une étude de compétition sur des cellules HEK-293 transfectées avec le récepteur de la ghréline humain a montré que l'UAG déplaçait la ghréline radiomarquée liée au récepteur de la ghréline avec une  $CI_{50}$  de 10 à 13 mM, tandis que la  $CI_{50}$  de la ghréline est de 7 à 10 nM (Bednarek et coll., 2000; Gaunavan de Zande et coll., 2007). L'UAG ne se lie donc pas au récepteur de la ghréline à des concentrations physiologiques, mais sa liaison à des concentrations supraphysiologiques révèle ses propriétés agonistes suite à la mesure d'une hausse de la concentration de calcium intracellulaire (Gaunavan de Zande et coll., 2007).

Une étude a montré que l'UAG diminue l'inflammation induite par les protéines bêta-amyloïdes fibrillaires dans les cellules microgliales N9 en culture en diminuant l'expression de l'ARNm de l'IL-6 et de l'IL-1beta, un effet qui n'est pas observé avec la ghréline. Pourtant, les cellules microgliales n'expriment pas le GHS-R1a. Ceci démontre que l'effet de l'UAG est

indépendant du GHS-R1a et du récepteur GRLR, et que l'UAG possède son propre récepteur (Bulgarelli et coll., 2009).

Selon la revue de Callaghan et Furness, on peut supposer qu'il existe un récepteur propre à l'UAG qui serait exprimé au niveau des hépatocytes, des cellules  $\beta$ -pancréatiques et des cardiomyocytes, tandis qu'il existerait aussi des récepteurs capables de lier à la fois la ghréline et l'UAG, nommés GRLR, qui seraient exprimés au niveau des adipocytes, des myoblastes, des ostéoblastes, des cardiomyocytes, des îlots pancréatiques, de certaines cellules cancéreuses, au niveau des artères coronaires et des cellules endothéliales vasculaires (Callaghan et Furness, 2014).

### **1.3.6 Rôles physiologiques, métaboliques et pathophysiologiques de la ghréline et de l'UAG liés au système cardiovasculaire**

La ghréline et l'UAG sont impliquées dans un large spectre de fonctions : la sécrétion d'HC (Takaya et coll., 2000), l'appétit (Date et coll., 2002), les fonctions gastro-intestinales (Trudel et coll., 2002), le métabolisme du glucose et des acides gras (Broglio et coll., 2001; Rodriguez et coll., 2009), l'apprentissage, la mémorisation (Diano et coll., 2006), l'humeur (Chuang et Zigman, 2010), le rythme circadien (Szentirmai et coll., 2007), la reproduction (Benso et coll., 2013) et la maturation des lymphocytes T (Dixit et coll., 2007). Leurs effets sont parfois antagonistiques l'un envers l'autre, et parfois synergiques. Les prochains paragraphes se concentreront sur les principaux rôles de la ghréline et de l'UAG, et en particulier ceux en lien avec les pathologies cardiovasculaires.

#### **1.3.6.1 La prise de poids**

Initialement, les études sur les humains montraient une corrélation inverse entre la concentration circulante de ghréline totale et l'index de masse corporelle (Monti et coll., 2006). Par la suite, les études ont montré que les niveaux circulants de la forme acylée de la ghréline sont plus élevés en réponse à une diète hyperlipidique, dont chez les sujets qui présentent une obésité associée au diabète de type II (Barazzoni et coll., 2013; Rodríguez et coll., 2012), bien

que l'expression du récepteur de la ghréline au niveau du tissu adipeux soit diminuée (Rodriguez et coll., 2009). En effet, l'administration de ghréline est connue pour augmenter la masse grasseuse (Tschop et coll., 2000) en stimulant l'adipogenèse (Choi et coll., 2003) de manière indépendante du type de diète (Perez-Tilve et coll., 2011).

L'administration de l'UAG ou d'un fragment cyclisé des aa 6-13 de l'UAG (cUAG<sub>6-13</sub> ou AZP-531) (4 nmol/kg/h chez des souris C57BL/6 pendant 2 semaines avant d'être soumises à une diète riche en lipides de 2 semaines) à l'aide de mini-pompe osmotique a empêché la prise de poids et de masse grasseuse sans toutefois affecter la prise de nourriture (Delhanty et coll., 2013).

### **1.3.6.2 Effets de la ghréline et de l'UAG sur le métabolisme**

#### **1.3.6.5.1 Le glucose**

Au niveau des cellules  $\beta$ -pancréatiques, la liaison de la ghréline sur le récepteur de la ghréline inhibe la sécrétion de l'insuline comme décrite au point 1.3.5.3 (Broglia et coll., 2001). Certaines études ont émis l'hypothèse que l'injection de ghréline pourrait conduire au développement du diabète de type 2 (Vestergaard et coll., 2008). Au niveau des cellules  $\alpha$ -pancréatiques, la ghréline stimule la sécrétion de glucagon, ce qui contribue à augmenter la sécrétion du glucose et à contrebalancer les effets de l'insuline (Chuang et coll., 2011). En effet, une étude chez l'homme a montré que l'injection intraveineuse (i.v.) d'une seule dose pharmacologique de ghréline à 1  $\mu$ g/kg est suffisante pour provoquer une augmentation de la glycémie et une réduction de l'insulinémie (Broglia et coll., 2001). De plus, la perfusion à une dose de 300 pmol/kg/h a provoqué une résistance à l'insuline (Vestergaard et coll., 2008). Chez les sujets obèses, on retrouve une corrélation positive entre les concentrations de ghréline et d'insuline en circulation, indiquant que la ghréline favorise la résistance à l'insuline (Rodriguez et coll., 2009). Au contraire, l'utilisation d'un inhibiteur de la GOAT sur des cellules des îlots de Langerhans humaines (Barnett et coll., 2010) ou d'un antagoniste du récepteur de la ghréline chez le rat (Esler et coll., 2007) ou encore la délétion du GHS-R chez la souris (Lin et coll., 2011; Longo et coll., 2008) conduit à une augmentation de la sensibilité à l'insuline.

L'UAG présente des effets métaboliques différents de la ghréline. Chez les cardiomyocytes HL-1, l'UAG, à une concentration de 3  $\mu$ M, augmente l'internalisation du glucose en stimulant la translocation de GLUT4 à la surface membranaire en 20 minutes et renverse même l'effet inhibiteur de la ghréline sur l'insuline (tous les deux à la même concentration que l'UAG) (Lear et coll., 2010). L'administration d'AZP531 à l'aide d'une mini-pompe osmotique a permis de prévenir la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose induite par une diète riche en lipides chez la souris C57BL/6 (Delhanty et coll., 2013). La prévention de la résistance à l'insuline par l'UAG et l'AZP531 peut être expliquée en partie par l'inhibition de la suppression du substrat du récepteur de l'insuline 1 (IRS1, *insulin receptor substrate 1*) hépatique induite par la diète riche en lipides (Delhanty et coll., 2013) et par la stimulation de la sécrétion de l'insuline (Benso et coll., 2012; Gauna et coll., 2007). L'UAG est aussi connue pour diminuer la production de glucose hépatique (Gauna et van der Lely, 2005).

### 1.3.6.5.2 Les lipides

La ghréline et l'UAG inhibent la lipolyse stimulée par l'isoprotérénol au niveau d'adipocytes isolés du gras épидидymaire de rats Wistar, et ce, de manière indépendante du récepteur de la ghréline puisque le gène du récepteur de la ghréline n'a pas été détecté dans ces adipocytes (Muccioli et coll., 2004). La voie impliquée dans cette inhibition impliquerait l'activation de PI3K/Akt et de la phosphodiesterase 3B (PDE3B), ce qui empêcherait l'accumulation d'AMPC (Baragli et coll., 2011). Toutefois, la ghréline activerait potentiellement la lipolyse au niveau des adipocytes par la relâche de l'HC. En effet, l'HC est connue pour stimuler les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques et activer la lipolyse (voir section 1.1.5.3.2) (Thompson et coll., 2004; Yang et coll., 1996). L'effet de la ghréline sur la lipolyse dépendra donc de l'équilibre entre son effet anti-lipolytique et la quantité d'HC relâchée qui activera la lipolyse. Au niveau des pré-adipocytes 3T3-L1, la ghréline et l'UAG ont stimulé leur prolifération, leur différenciation et l'incorporation des acides gras dans les cellules (Miegeu et coll., 2011).

L'UAG possède des effets inhibiteurs de la HSL (Kos et coll., 2009), ce qui diminue la lipolyse. De plus, dans des cultures cellulaires d'adipocytes humains primaires (Kos et coll.,

2009) et de 3T3-L1 (Miegeu et coll., 2011), l'incubation de l'UAG à des concentrations de 10 nM et de 10 pM, respectivement, a diminué la relâche de glycérol dans le milieu de culture en comparaison avec la ghréline aux mêmes concentrations, indiquant que l'UAG possède des effets anti-lipolytiques plus puissants que la ghréline. Par contre, des souris transgéniques surexprimant l'UAG présentent une masse adipeuse d'au moins 35% plus faible et une augmentation de 28% de la sensibilité à l'insuline comparativement aux souris de type sauvage (Zhang et coll., 2008).

La perfusion d'UAG à une dose de 1 mg/kg/h pour une durée de 16 h chez l'homme a diminué par plus de 50% les concentrations d'AGNE circulants (Benso et coll., 2012). L'administration d'UAG (1,0 µg/kg par voie i.v.) chez l'homme a aussi contré l'effet de la ghréline, à la même concentration, sur l'inhibition de la relâche d'insuline et le taux élevé de glucose en circulation (Barazzoni et coll., 2007; Broglio et coll., 2004). Toutefois, une étude récente n'a montré aucun renversement des effets de la ghréline, ni d'effet de l'UAG seule, sur les taux plasmatiques de glucagon, d'acides gras, de glucose, d'insuline et d'HC (Tong et coll., 2014).

### **1.3.6.3 Effet anti-apoptotique de la ghréline**

L'incubation de ghréline avec les cardiomyocytes H9c2 en culture inhibe l'apoptose induite par la doxorubicine en activant les voies ERK1/2 et Akt. Il est à noter que le récepteur de la ghréline n'est pas détecté dans cette lignée cellulaire (Baldanzi et coll., 2002). Une étude avec des cellules pancréatiques β HIT-T15 a montré que la ghréline active les voies Akt et ERK1/2, mais aussi que l'expression de Bcl-2 était augmentée et des protéines Bax et caspase-3 étaient diminuées, ainsi que la relâche de cytochrome c mitochondriale (Zhang et coll., 2010). De manière similaire, l'incubation de l'UAG à 100 nM stimule la prolifération des cellules β INS-1E et des îlots pancréatiques HIT-T15 *in vitro* et protège contre l'apoptose induite par l'IFN-γ (100 ng/mL) et le TNF-α (200 ng/mL) de manière concomitante en activant les voies PKA, ERK1/2 et PI3K/Akt (Granata et coll., 2007).

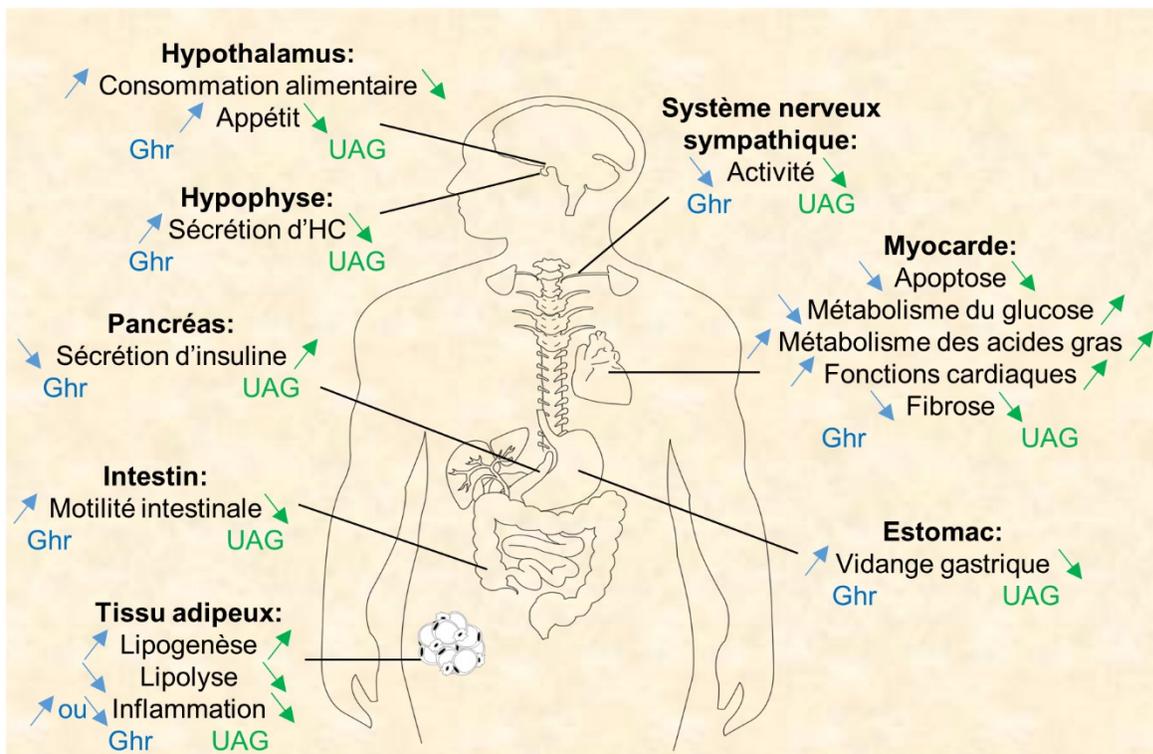
#### 1.3.6.4 Effet anti-inflammatoire de la ghréline

Dans une étude d'ischémie/reperfusion de l'intestin grêle, la ghréline a diminué l'infiltration des neutrophiles et la production et sécrétion locale des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ , mais aussi dans un organe plus éloigné, les poumons. Ces effets anti-inflammatoires de la ghréline, ainsi que l'activation de la voie mTOR et S6K1 (*mitogen-stimulated protein kinase p70 ribosomal protein S6 kinase 1*) joueraient un rôle dans l'atténuation des dommages liés à l'ischémie/reperfusion (Zhang et coll., 2013). De manière similaire, la perfusion de l'UAG et de l'AZP531 (4 nmol/kg/h pendant 2 semaines) à l'aide de mini-pompes osmotiques à des souris C57BL/6 diminue l'inflammation induite par une diète riche en lipides au niveau du tissu adipeux. Notamment, on observe une diminution de l'expression de l'ARNm de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ , ainsi qu'une augmentation de la population de macrophages de type M2 dans le tissu adipeux (Delhanty et coll., 2013). Dans une autre étude chez la souris, l'injection de vecteurs recombinants dérivés du virus adéno-associé codant pour le gène de la ghréline dans la zone infarctée suite à une ischémie du myocarde a conduit à une augmentation de la concentration d'UAG dans le cœur et en circulation. Ce résultat est associé à une amélioration de la fonction et du remodelage cardiaque et à une diminution de l'expression d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  dans le cœur (Ruozi et coll., 2015). Il est intéressant de noter que l'injection de LPS chez le rat diminue la concentration circulante de ghréline totale, ce qui résulte en une suppression de l'appétit, en stimulant la production d'IL-1 $\beta$  et de prostaglandines, et que l'administration exogène de la ghréline renverse ces effets (Wang et coll., 2006).

#### 1.3.6.5 Effet de la ghréline sur le stress oxydatif

L'incubation de la ghréline avec des aortes de rats hypertendus spontanément (SHR) inhibe la NADPH oxydase diminuant ainsi la production de ROS (Kawczynska-Drozd et coll., 2006). Dans un modèle d'ischémie/reperfusion de l'estomac, la ghréline a diminué l'expression d'iNOS dans les neutrophiles et la quantité de TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), un marqueur du stress oxydatif, et a augmenté l'expression de la forme réduite du glutathion (GSH), un éboueur des ROS dans l'homogénat de tissu gastrique (El Eter et coll., 2007). Au niveau des préadipocytes 3T3-L1 en culture, l'incubation avec la ghréline a causé une augmentation de l'activité de SOD, CAT et GSH-Px, des enzymes anti-oxydantes, ainsi qu'une

diminution de la production de malondialdéhyde (MDA), un produit d'oxydation des lipides (Zwirska-Korcza et coll., 2007). De manière similaire, dans une étude chez le rat, le traitement à l'UAG (100 µg/kg, sous-cutané (s.c.) deux fois par jour pendant 10 jours) a diminué les dommages au myocarde induits par l'isoprotérénol. Les résultats ont montré une amélioration de la fonction cardiaque par une augmentation de la dérivée de pression par rapport au temps maximale ( $dP/dt_{max}$ ) et une diminution de  $dP/dt_{min}$  et de la pression diastolique, une amélioration de la survie des cardiomyocytes par une réduction de LDH en circulation, une amélioration de la peroxydation des lipides par une diminution de la quantité de MDA et de CD (*conjugated dienes*) dans le cœur et le plasma, une amélioration de l'hypertrophie, de la nécrose et du remodelage par une diminution du collagène interstitiel (Li et coll., 2006).



**Figure 36. Résumé des similarités et différences des effets de la ghréline et de l'UAG**

Ghr, ghréline; HC, hormone de croissance; UAG, ghréline désacylée (*unacylated ghrelin*).

Figure inspirée et traduite de (Jeffery et coll., 2011; Muller et coll., 2015).

### **1.3.7 Rôles de l'UAG dans la pathologie de l'ischémie/reperfusion du myocarde**

Dans une étude récente chez la souris, l'UAG (1 mg/kg) ou l'AZP531(1 mg/kg) ont été injectés par voie i.v. 5 min avant la reperfusion suite à une ischémie de 45 min, et une seconde fois 30 min après le début de la reperfusion d'une durée de 24 heures. L'UAG a diminué la taille de l'infarctus de 29%, tandis que l'AZP531 l'a diminué de 42%. L'UAG a activé les voies de signalisation de survie par une augmentation de la phosphorylation de Akt et de ERK1/2, ainsi que de deux substrats de mTORC1, les protéines S6 et 4E-BP1 qui favorisent l'autophagie et la synthèse protéique à 15 min de reperfusion, mais pas à 24 h. L'UAG a aussi réduit l'apoptose en diminuant l'expression protéique de Bax et l'activité de la caspase-3, et a amélioré le stress oxydatif par une augmentation de l'expression de la catalase à 15 min de reperfusion, ainsi que l'expression de la SOD et de la catalase à 24 h de reperfusion. Toutefois, l'UAG n'a pas modifié l'ouverture du PTPm, la capacité de rétention du calcium (CRC) mitochondriale, et n'a pas amélioré la respiration mitochondriale (Harrisseh et coll., 2017).

## **1.4 Les peptides synthétiques dérivés des GHS**

### **1.4.1 Hexaréline**

Comme il a été mentionné dans la section ghréline 1.3.3, la ghréline est une protéine instable en circulation avec une courte demi-vie et qui est rapidement désacylée. Ces caractéristiques de la ghréline sont des points limitants pour son usage dans les cas cliniques. Les sécrétagogues de l'hormone de croissance sont des petits peptides synthétiques qui n'ont pas de structure commune avec la ghréline, tel que l'hexapeptide GHRP-6, mais qui se lient au récepteur de la ghréline et stimulent la sécrétion d'HC (Bowers et coll., 1984). À partir de la structure du GHRP-6 (figure 38), plusieurs GHS ont découlé, incluant l'hexaréline qui présente une méthylation de la D-tryptophane (figure 38), lui conférant une puissance et une stabilité plus élevée, et une toxicité moindre en comparaison avec le GHRP-6 (Deghenghi et coll., 1994). L'hexaréline s'est rendue jusqu'en essais cliniques de phase II, connue sous le nom d'Examorelin par la compagnie Europeptides, pour ses effets sur la relâche d'HC, mais a été

discontinué pour des raisons stratégiques (Suckling, 2006). Le tableau II résume certains GSH qui se sont rendus en essais cliniques et montre que cibler le récepteur de la ghréline n'est pas aussi prometteur qu'il semblait l'être comme sécrétagogue de l'HC. L'hexaréline présente des effets cardioprotecteurs (Bisi et coll., 1999; De Gennaro Colonna et coll., 1997a; Mao et coll., 2014; Xu et coll., 2012) et est encore utilisée à ce jour dans certaines investigations sur l'infarctus du myocarde (McDonald et coll., 2018). L'exploitation potentielle des effets cardioprotecteurs de l'hexaréline est cependant limitée en raison de sa double affinité envers les récepteurs de la ghréline et CD36 (Bodart et coll., 1999; Locatelli et coll., 1999; Ong et coll., 1998).

**Tableau II. Les mimétiques de la ghréline en essais cliniques**

	Nom	Compagnie	Nature	Chimique /Peptide	Phase	Traitement	Effets
Mimétique de la ghréline	Pralmorelin (GHRP-2)	Kaken Pharma, Sella Pharma	Agoniste	Hexapeptide	Approuvé	Diagnostic pour la déficience en HC	Stimule la sécrétion d'HC
	Macimorelin	Aeterna Zentaris	Agoniste	Chimique	Approuvé	Diagnostic pour la déficience en HC	Stimule la sécrétion d'HC
	Anamorelin	Helsinn, Ono	Agoniste	Chimique	Phase III	Cachexie associée au cancer	Stimule la sécrétion d'HC, d'IGF-1, d'IGFBP-3, l'appétit augmente le poids corporel
	Relamorelin	Rhythm	Agoniste	Pentapeptide	Phase IIb	Gastroparésie diabétique	Stimule la sécrétion d'HC et la motilité gastro-intestinale
	Ulimorelin	Lyric, Tranzyme	Agoniste	Chimique	Phase III, Inactif	Fonctions gastrointestinales, troubles nutritionnels	Stimule la sécrétion d'HC et la motilité gastro-intestinale
	Ipamorelin	Helsinn	Agoniste	Pentapeptide	Phase II, Inactif	Fonctions gastrointestinales	Augmente la matière fécale, la prise alimentaire et le gain de poids
	Capromorelin	Pfizer	Agoniste	Chimique	Phase II, Inactif	Fragilité chez les personnes âgées	Stimule la sécrétion d'HC et d'IGF-1
	Tabimorelin	Novo Nordisk	Agoniste	Chimique	Phase II, inactif	Déficience de l'HC	Stimule la sécrétion d'HC, augmente le poids corporel, inhibe le CYP3A4
	Ibutamoren	Merck	Agoniste	Chimique	Phase II, Inactif	Fibromyalgie, fragilité chez les personnes âgées Alzheimer	Stimule la sécrétion d'HC, d'IGF-1, d'IGFBP-3
	Examorelin (Hexaréline)	Europeptides	Agoniste	Hexapeptide	Phase II, inactif	Déficience de l'HC	Augmente la sécrétion d'HC
	[D-Lys <sup>3</sup> ]-GHRP-6		Antagoniste	Hexapeptide	Pas en essai clinique		
	PF 5190457	Pfizer	Agoniste inverse	Chimique	Phase I, inactif Phase Ib	Diabète de type 2 Dépendance à l'alcool	Stimule la sécrétion de l'insuline Inhibe l'effet de la ghréline sur l'envie de consommer de l'alcool
Mimétique de l'UAG	AZP531	Alizé Pharma	Pas un agoniste du récepteur de la ghréline	Octapeptide, UAG <sub>6-13</sub> cyclique	Phase II	Diabète de type 2	Améliore le contrôle de la glycémie, diminue l'hyperphagie et le poids corporel

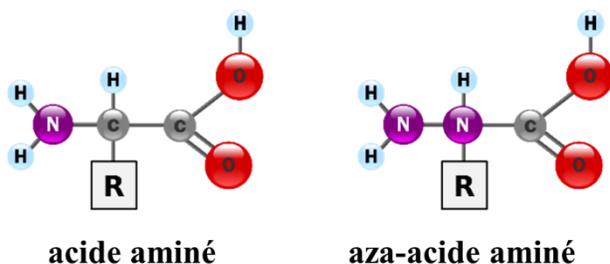
CYP3A4, cytochrome P450 3A4; GHRP, *growth hormone-releasing peptide*; récepteur de la ghréline, *growth hormone secretagogue receptor 1a*; HC, hormone de croissance; IGF-1, *insulin-like growth factor 1*; IGFBP-3, *insulin-like growth factor-binding protein 3*; UAG<sub>6-13</sub>, fragment 6-13 de la *unacylated ghrelin*. Tableau modifié et traduit de (Callaghan et Furness, 2014; Muller et coll., 2015; Rhodes et coll., 2018; Vodnik et coll., 2016).

### 1.4.2 EP 80317

Une étude sur le cœur isolé de rats soumis à une hypophysectomie a montré que l'hexaréline (80 µg/kg) à une dose 4 fois moins concentrée que la ghréline (320 µg/kg) préserve mieux la fonction cardiaque, le débit coronaire et la survie cellulaire. L'étude a conclu que les effets cardioprotecteurs de l'hexaréline étaient médiés en partie par le récepteur de la ghréline et principalement par une autre voie, possiblement le récepteur CD36 (Torsello et coll., 2003). Pour délimiter les effets cardioprotecteurs de l'hexaréline, notre laboratoire s'est concentré sur le récepteur CD36 dans le modèle d'I/RM. Dans une première étude, nous avons utilisé un analogue de l'hexaréline, le EP 80317, qui présente une substitution de son premier et troisième aa par les résidus Haic<sup>1</sup> (5-amino-1,2,4,5,6,7-tetrahydroazepino[3,2,1-hi]indol-4-one-2-carboxylate) et D-Lys<sup>3</sup> (figure 38), augmentant sa sélectivité envers le récepteur CD36 et perdant ainsi ses effets de sécrétion des HC (Cassoni et coll., 2001; Cheng et coll., 1989; Momany et coll., 1981) même s'il compétitionne avec la [<sup>125</sup>I, Tyr<sup>4</sup>]-ghréline sur des membranes d'hypothalamus (Muccioli et coll., 2001). Nos résultats ont montré qu'un pré-traitement quotidien avec le EP 80317 à une dose de 289 nmol/kg pendant 14 jours diminue la taille de l'infarctus suite à une I/RM chez la souris. Cet effet a été accompagné par une diminution de la lipolyse induite par les catécholamines, diminuant ainsi la concentration circulante d'AGNE et la surcharge au cœur dans ce contexte. Ces effets ont été accompagnés par une activation des protéines Akt et AMPK qui favorisent le métabolisme du glucose et une atténuation de la dysfonction cardiaque (Bessi et coll., 2012). Bien que le EP 80317 soit plus sélectif envers le CD36 que l'hexaréline, son affinité envers le récepteur de la ghréline n'est pas négligeable.

### 1.4.3 L'azapeptide CP-3(iv)

L'équipe de Ong a collaboré avec l'équipe de Lubell afin de synthétiser des ligands qui seraient encore plus sélectifs envers le CD36. En se basant sur la structure du GHRP-6, la substitution d'un aa par un aza-aa à différentes positions a permis de modifier la sélectivité de l'azapeptide envers le récepteur de la ghréline et le récepteur CD36, ainsi que la réponse engendrée suite à sa liaison avec le CD36 (Proulx et coll., 2012). Un aza-aa est un aa dont le carbone en position  $\alpha$  a été substitué par un azote (figure 37). Cette substitution cause une diminution de la propriété électrophile du carbone adjacent à l' $\alpha$ -aza, lui conférant une résistance à la dégradation par des peptidases (Greenlee et coll., 1984; Tal-Gan et coll., 2011). De plus, l'insertion d'un aza-aa dans un peptide cause un changement de conformation dans sa structure secondaire par la présence d'un repliement de type coude- $\beta$ , ce qui fait augmenter la stabilité du peptide et peut faire augmenter son affinité envers une protéine (Proulx et coll., 2012). Ces propriétés font des azapeptides un agent thérapeutique prometteur.



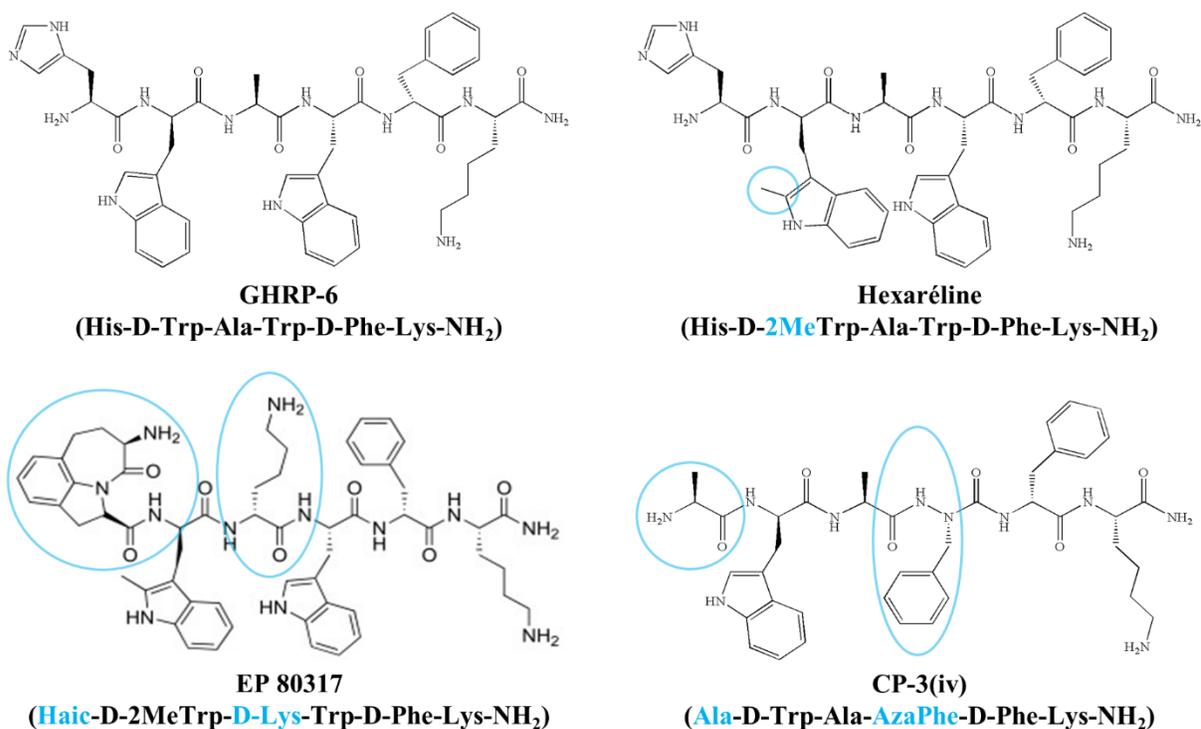
**Figure 37. Structure d'un acide aminé et d'un aza-acide aminé**

Figure modifiée et créditée à Yassine Mrabet.

Selon la structure du GHRP-6, les aa aromatiques D-Trp<sup>2</sup> et Trp<sup>4</sup> aideraient à son interaction avec les Lys164 et Lys166 chargées positivement sur le CD36 (Sabatino et coll., 2011). Toutefois, l'instabilité des aza-Trp dans un milieu acide a mené à la substitution des Trp par d'autres aa aromatiques. Parmi les azapeptides synthétisés par substitution des D-Trp<sup>2</sup>, Ala<sup>3</sup> et Trp<sup>4</sup> par des résidues aza, la substitution des aa His<sup>1</sup> et Trp<sup>4</sup> par les aa Ala<sup>1</sup> et AzaPhe<sup>4</sup> (figure 38) a permis la synthèse d'un azapeptide qui maintient sa sélectivité envers le CD36, mais présente une affinité réduite envers le récepteur de la ghréline de plus de 1000 fois ( $CI_{50}=6,08 \times 10^{-9} M$  pour le GHRP-6 vs.  $CI_{50} \gg 10^{-5} M$  pour [AzaPhe<sup>4</sup>]-GHRP-6), tel que

déterminé par une étude de compétition avec la ghréline radiomarquée avec de l'iode 125 [ $I^{125}$ ] sur des membranes de cellules transfectées avec le récepteur de la ghréline (Ong et coll., 1998; Proulx et coll., 2012). De plus, l'azapeptide [Ala1, AzaPhe<sup>4</sup>]-GHRP-6 (ou CP-3(iv)), présente des effets pro-angiogéniques suite à l'induction de la croissance de microvaisseaux de choroïdes en culture, en comparaison avec les [azaTyr<sup>4</sup>]-GHRP-6, [Ala1, azaPhe<sup>2</sup>]-GHRP-6 et [azaLeu<sup>3</sup>, Ala<sup>6</sup>]-GHRP-6 qui ont des effets anti-angiogéniques (Proulx et coll., 2012).

La technique de résonance des plasmons de surface a été utilisée pour le criblage de ligands synthétiques du récepteur CD36 en fonction de leur affinité envers le récepteur. Cette technique repose sur le fait que des plasmons à la surface d'une mince couche d'or reposant sur un support en verre entrent en résonance lorsqu'ils sont en contact avec un faisceau lumineux. Le CD36 est fixé de manière covalente à la surface d'une mince couche d'or à une concentration donnée. L'ajout de peptides à différentes concentrations qui se lieront avec le CD36 fera augmenter la masse et changera l'angle de réflexion du faisceau lumineux, permettant de calculer les  $K_D$  (Maynard et coll., 2009). Les résultats ont montré que l'affinité en terme de  $K_D$  est la plus élevée pour le CP-3(iv) (0,72  $\mu$ M), suivie du EP 80317 (2,75  $\mu$ M) et du GHRP-6 (25,6  $\mu$ M) (Bolduc et coll., 2011). Dans l'ensemble, le CP-3(iv) présente une meilleure affinité et sélectivité envers le CD36 (Bolduc et coll., 2011; Proulx et coll., 2012) et des effets pro-angiogéniques qui sont favorables dans la pathologie de l'I/RM (Lee et coll., 2016; Liu et coll., 2014). Pour ces raisons, nous avons choisi le CP-3(iv) comme ligand du CD36 afin d'étudier ses effets cardioprotecteurs et leurs mécanismes.



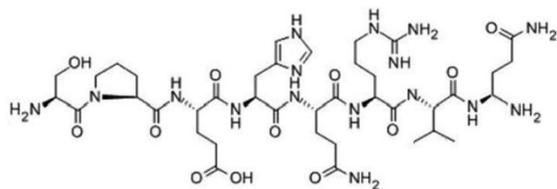
**Figure 38. Le GHRP-6 et ses analogues**

Le résidu en bleu est encerclé dans la structure et dénote la différence avec le peptide parent (GHRP-6). Figure modifiée de (Curia et coll., 2014); Brevet É.-U. No 8,435,954, (B2), 2013.

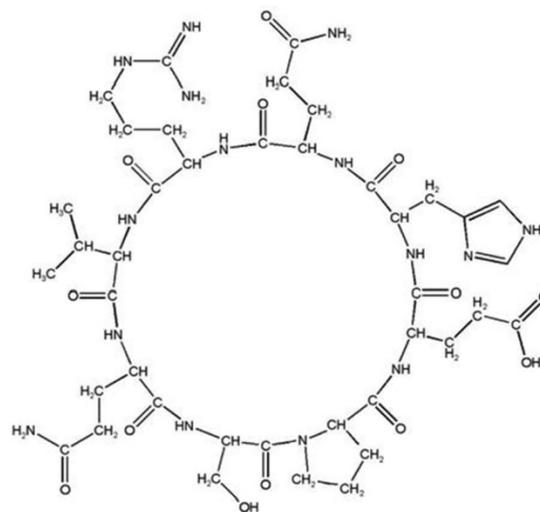
#### 1.4.4 Les ligands dérivés de la désacyl-ghréline

Dans le but de trouver la séquence la plus courte de l'UAG responsable de ses effets anti-diabétiques, la synthèse de fragments peptidiques dérivés de l'UAG a montré que les 5 premiers aa et les 12 derniers aa de l'UAG n'ont pas d'effet sur la survie des cellules  $\beta$ -pancréatiques HIT-T15 en absence de sérum ou en présence des cytokines IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Granata et coll., 2012). Ensuite, en testant différentes séquences entre ces deux extrémités, l'équipe de Ghigo a observé que le fragment 6-13 (figure 39) présentait le meilleur effet sur la survie des cellules HIT-T15, de façon similaire à l'UAG. Les auteurs ont aussi effectué des modifications en créant des mutants de la séquence 6-13 en substituant chaque aa par une alanine ou en changeant leur configuration en configuration D ou encore en configurant tous les aa en configuration D. Toutefois, l'UAG<sub>6-13</sub> non modifiée a présenté le fragment peptidique avec la meilleure bioactivité sur la survie des cellules HIT-T15 et des îlots pancréatiques humains, a

diminué l'apoptose et la glycémie et a augmenté l'insulinémie chez les rats diabétiques ; l'UAG<sub>6-13</sub> a aussi diminué la production de ROS induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les cellules endothéliales progénitrices (Granata et coll., 2012). La cyclisation de l'UAG<sub>6-13</sub> (cUAG<sub>6-13</sub> ou AZP-531) (figure 39) a montré des effets similaires à l'UAG<sub>6-13</sub> dans les essais de survie sur les cellules HIT-T15 et de production de ROS induits par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les cellules endothéliales progénitrices. Il est à noter que les fragments UAG<sub>6-13</sub> et AZP-531 ne possèdent pas la séquence des 4 premiers aa de la ghréline qui lui est cruciale pour activer son récepteur de la ghréline (Bednarek et coll., 2000). Des études pharmacocinétiques comparant l'UAG<sub>6-13</sub> et l'AZP-531 ont montré que 50% de l'UAG<sub>6-13</sub> est dégradé en 5 min suite à son incubation dans du plasma humain à 37°C, en comparaison avec l'AZP-531 qui n'a montré aucun signe de dégradation même après 3 jours d'incubation (Julien et coll., 2012). Chez le rat, la demi-vie de l'UAG<sub>6-13</sub> a été estimée à 16 min après son administration par voie intraveineuse. En comparaison, les demi-vies de l'AZP-531 s.c. et par voie i.v. étaient de 27 et 28 min, respectivement, chez le rat (Julien et coll., 2012) et de 2-3 h chez l'humain par voie sous-cutanée (Allas et coll., 2016). À ce jour, la compagnie Alizé Pharma est la seule à utiliser un peptide dérivé de l'UAG en essai clinique (tableau II). En fait, des essais cliniques de phase I avec l'AZP-531 pour le traitement du diabète de type 2 (Allas et coll., 2016) ont été complétés et des études de phase II sont en cours pour ses effets anti-hyperphagiques dans la pathologie du syndrome de Prader-Willi (Allas et coll., 2018). Nous nous sommes intéressés à l'évaluation des effets cardioprotecteurs de l'UAG<sub>6-13</sub> de forme linéaire comme nouvel agent pharmacologique dans la pathologie de l'I/RM.



**UAG<sub>6-13</sub>**



**AZP-531**

**Figure 39. Structure de l'UAG<sub>6-13</sub> et de l'AZP-531**

Figure tirée de (Julien et coll., 2012).

**Tableau III. Ligands endogènes et synthétiques du récepteur de la ghréline et des récepteurs CD36 et de l'UAG.**

Peptide	Séquence					
<b>Ghréline</b>	Gly-Ser-Ser(octanoyl)-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg					
<b>Hexaréline</b>	His-D-2-methyl-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys- NH <sub>2</sub>					
<b>EP 80317</b>	Haic-D-2-methyl-Trp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys- NH <sub>2</sub>					
<b>CP-3(iv)</b>	Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>					
<b>UAG</b>	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg					
<b>UAG<sub>6-13</sub></b>	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln- NH <sub>2</sub>					
Peptide	<b>Ghréline</b>	<b>Hexaréline</b>	<b>EP 80317</b>	<b>CP-3(iv)</b>	<b>UAG</b>	<b>UAG<sub>6-13</sub></b>
Source	Endogène	Synthétique	Synthétique	Synthétique	Endogène	Synthétique
Structure	28 aa	6 aa	6 aa	6 aa	28 aa	8 aa
Demi-vie	9-11 min <sup>a</sup> , 27-31 min <sup>b</sup>	57-71 min <sup>c</sup>	n.d.	n.d.	32-39 min <sup>a</sup>	<16 min <sup>d</sup>
Sélectivité envers le récepteur de la ghréline	IC <sub>50</sub> = 10x10 <sup>-9</sup> M <sup>e</sup>	IC <sub>50</sub> = 1,6x10 <sup>-8</sup> M <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> = 7,5x10 <sup>-7</sup> M <sup>f</sup>	IC <sub>50</sub> = >>10 <sup>-5</sup> M <sup>f</sup>	IC <sub>50</sub> = 13x10 <sup>-3</sup> M <sup>e</sup>	n.d.
Sélectivité envers le CD36	n.d.	IC <sub>50</sub> = 2,1x10 <sup>-6</sup> M <sup>f</sup>	IC <sub>50</sub> = 1,1x10 <sup>-6</sup> M <sup>f</sup>	IC <sub>50</sub> = 7,6x10 <sup>-6</sup> M <sup>f</sup>	n.d.	n.d.

Tableau modifié et traduit de (MaoTokudome et Kishimoto, 2014; Proulx et coll., 2012).

a, après perfusion chez des sujets humains (Tong et coll., 2013)

b, après injection i.v. chez des sujets humains (Akamizu et coll., 2004)

c, après injection i.v. chez le rat (Roumi et coll., 2000)

d, détecté dans une souris sur trois après injection i.v. (Julien et coll., 2012)

e, (Bednarek et coll., 2000; Gaunavan de Zande et coll., 2007)

f, (Proulx et coll., 2012)

## **Chapitre 2 : HYPOTHÈSES, OBJECTIFS DE RECHERCHE ET MÉTHODOLOGIE**

## 2.1 Hypothèses et objectifs de recherche

Depuis la fin du vingtième siècle, la découverte que l'hexaréline, un GHRP, qui possède des effets cardioprotecteurs (De Gennaro Colonna et coll., 1997a; Locatelli et coll., 1999; Rossoni et coll., 1998) a suscité l'intérêt de plusieurs groupes de recherche, incluant le nôtre (Bodart et coll., 2002; Ong et coll., 1998). Les études initiales avec l'hexaréline chez des rats hyposectomisés ont révélé que les effets cardioprotecteurs des GHRPs étaient, en partie, indépendants de leurs effets sur la relâche de l'hormone de croissance (Locatelli et coll., 1999). Le groupe de Ong a identifié que l'hexaréline peut lier un autre récepteur que le récepteur de la ghréline, qui est le récepteur CD36 (Bodart et coll., 2002). À cette période (début des années 2000), des publications, notamment du groupe de Silverstein, démontraient un rôle important du récepteur CD36 dans la pathologie de l'athérosclérose (Febbraio et coll., 2000; Nicholson et coll., 2000; Silverstein et Febbraio, 2000). Notre groupe a travaillé avec le EP 80317, un analogue synthétique du GHRP-6 qui présente une sélectivité 10 fois supérieure envers le CD36 vs. le récepteur de la ghréline en comparaison à celle de l'hexaréline, qui a servi de preuve de concept pour le développement d'agents pharmacologiques ciblant le CD36 dans l'athérosclérose (Marleau et coll., 2005). Les études suivantes ont caractérisé certains mécanismes d'action du EP 80317 dans l'athérosclérose (Avallone et coll., 2006; Bujold et coll., 2009; Harb et coll., 2009). En parallèle, nous avons un projet qui avait pour but de caractériser le rôle du CD36, à l'aide du EP 80317, dans la pathologie de l'I/RM étant donné la localisation du CD36 au niveau des cardiomyocytes et de son rôle dans le transport des acides gras. Mes travaux de maîtrise visaient à investiguer les effets du EP 80317 sur les organes en périphérie qui contribuent à protéger le cœur contre les dommages induits par l'I/RM chez la souris (Bessi et coll., 2012). Dans la publication issue de ces travaux, nous avons montré qu'en plus d'activer les voies Akt et AMPK au niveau cardiaque, favorisant la survie et le métabolisme du glucose, le EP 80317 agissait aussi sur le tissu adipeux. En effet, nous avons observé une réduction de la lipolyse et une augmentation du stockage des triglycérides, ce qui a induit une baisse de la concentration des acides gras en circulation lors de la reperfusion après l'ischémie du myocarde, conduisant à une diminution de la quantité d'AGCL internalisés et oxydés dans les cardiomyocytes. Ces résultats expliqueraient, au moins en partie, la diminution de la taille de l'infarctus et la préservation de la fonction cardiaque en comparaison au groupe témoin. Afin

de poursuivre des études avec des ligands plus puissants et sélectifs du récepteur CD36, une nouvelle famille de dérivés du GHRP-6, les azapeptides, a été synthétisée par une collaboration des groupes Ong et Lubell de l'Université de Montréal (Proulx et coll., 2012). Plusieurs projets sont en cours dans nos laboratoires pour étudier le potentiel thérapeutique des azapeptides en ciblant le CD36 dans différentes pathologies, telles que la dégénérescence maculaire et l'athérosclérose. Mes travaux de doctorat ont porté sur l'élucidation des mécanismes cardioprotecteurs du CD36 dans la pathologie de l'I/RM par deux approches, pharmacologique (azapeptide) et génique (souris déficientes en CD36. En se basant sur nos travaux antérieurs, les effets anti-athérogéniques de l'hexaréline et du EP 80317 ont convergé sur l'activation de PPAR $\gamma$  au niveau des macrophages (Avallone et coll., 2006; Bujold et coll., 2009). Nous avons émis l'hypothèse que la sélectivité accrue de l'azapeptide CP-3(iv) envers le CD36 stimulerait le facteur de transcription PPAR $\gamma$  au niveau du tissu adipeux, menant à la protection du myocarde contre une I/RM en conséquence d'une synthèse et d'une sécrétion accrue d'adiponectine en circulation. Les objectifs de la première étude présentée dans le chapitre 3.3 étaient de 1) évaluer le CD36 comme cible thérapeutique potentielle contre les dommages causés par l'I/RM; 2) établir les mécanismes conduisant à une diminution de la taille de l'infarctus et de la dysfonction cardiaque; 3) déterminer la contribution de l'adiponectine sur les effets cardioprotecteurs du CP-3(iv).

Pour la deuxième étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du potentiel cardioprotecteur d'un fragment peptidique de l'UAG, un peptide qui possède un lien avec les GHS qui sont à l'origine de nos travaux actuels sur le CD36. En effet, l'UAG est le peptide désacylé de la ghréline, l'hormone endogène liant le récepteur GHS-R1a de l'hexaréline. Le groupe de Ong s'était d'abord intéressé à identifier le récepteur de l'UAG, encore inconnu, le faisant, ils ont identifié le récepteur des peptides RF-amide (QRFP, *pyroglutamylated RF-amide peptides*), le récepteur GRP103 à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G (GPR103, *G protein-coupled receptor 103*) (Mulumba et coll., 2010). Les études subséquentes ont investigué le rôle de ce récepteur et de ses ligands endogènes (Jossart et coll., 2014; Mulumba et coll., 2015). En 2012, la publication par le groupe de Ghigo sur les effets pro-survie, anti-oxydatif et antidiabétique de différents fragments peptidiques de l'UAG (Granata et coll., 2012) a stimulé notre intérêt pour l'utilisation de l'un de ces fragments peptidiques,

l'UAG<sub>6-13</sub>, dans la pathologie de l'I/RM. Le peu d'information sur l'UAG dans la littérature fait de l'UAG<sub>6-13</sub> un agent pharmacologique nouveau et intéressant à investiguer. Nous avons émis l'hypothèse que l'UAG<sub>6-13</sub> inhibe les voies pro-apoptotiques dans le myocarde, diminuant les dommages et la dysfonction cardiaque suite à une I/RM. Les objectifs de la deuxième étude présentée au chapitre 3.4 étaient de 1) évaluer les effets cardioprotecteurs d'un traitement avec l'UAG<sub>6-13</sub> précédant une I/RM; 2) établir les mécanismes qui conduisent à une diminution de la taille de l'infarctus et de la dysfonction cardiaque; 3) déterminer la contribution du système ghréline/récepteur de la ghréline dans les effets cardioprotecteurs de l'UAG<sub>6-13</sub>.

## **2.2 La méthodologie**

### **2.2.1 Le modèle animal**

La souris est un modèle animal qui offre plusieurs avantages. En effet, il s'agit d'un modèle dont la reproduction se fait rapidement, dont le génome est déjà bien caractérisé, et dont le coût d'entretien est relativement peu élevé. De plus, la facilité à développer un modèle transgénique chez la souris, que ce soit pour invalider ou surexprimer un gène dans un organe cible ou dans l'organisme entier fait de lui un modèle attrayant pour les études. Sa petite taille permet également d'injecter une plus petite quantité d'une substance pharmacologique, même dans le cas où il faut augmenter la dose pour obtenir les effets pharmacologiques recherchés. Les avancements technologiques permettent de plus en plus de miniaturiser les instruments et d'augmenter la sensibilité des essais, nous permettant ainsi de les utiliser et de les appliquer chez le modèle murin. Le grand nombre de publications et d'informations existant portant sur la souris est vaste et ne cessera pas d'augmenter (Virag et Lust, 2011). Il a maintenant été mis en évidence que la souris possède plusieurs gènes et voies de signalisation impliqués dans le développement du cœur et des vaisseaux qui sont similaires à l'homme (Tarnavski et coll., 2004). Bien que sa petite taille lui confère plusieurs avantages, les inconvénients pouvant être observés lors d'expérimentations chirurgicales cardiaques incluent sa fréquence cardiaque très rapide et la nécessité d'une grande dextérité manuelle.

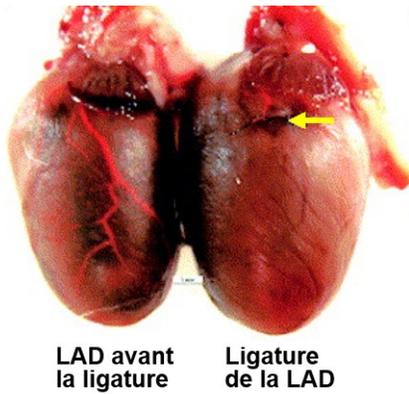
## **2.2.2 La technique d'I/RM**

### **2.2.2.1 Ligature de l'artère coronaire antérieure descendante gauche**

L'utilisation de modèles animaux permet d'étudier l'efficacité de différentes thérapies pharmacologiques dans la pathologie de l'I/RM. La ligature de l'artère coronaire antérieure descendante gauche (figures 40 et 41) est un modèle qui requiert le développement de bonnes techniques chirurgicales, mais une fois maîtrisées, il permet de reproduire de manière fiable et efficace les évènements de l'I/RM observés en clinique (Bohl et coll., 2009). La ligature de la LAD chez la souris a été développée par Johns et Olson (Johns et Olson, 1954), puis la technique a été modifiée par l'ajout de la reperfusion après l'ischémie afin d'étudier la pathologie de l'I/RM (Michael et coll., 1995). La LAD est l'artère principale qui irrigue tout le ventricule gauche du cœur et l'étude de Johns et Olson a montré que la ligature des deux artères coronaires (droite et gauche) cause un taux de mortalité de 100% (Johns et Olson, 1954).

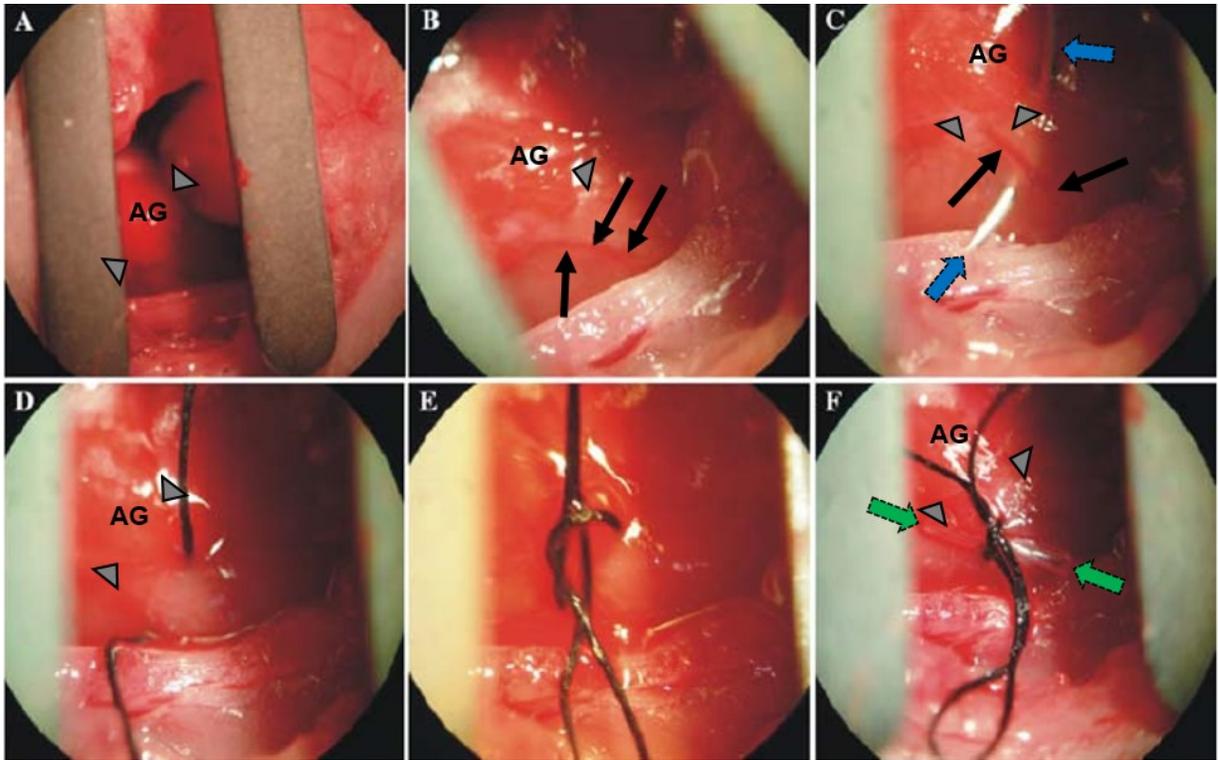
La chirurgie requiert l'utilisation d'anesthésiques qui peuvent affecter la fonction cardiaque. En général, ils causent un ralentissement de la fréquence cardiaque et une dilatation du ventricule gauche (Yang et coll., 1999). Parmi les différents anesthésiques, l'isoflurane est un anesthésique volatil affectant peu la fonction cardiaque en comparaison aux anesthésiques injectables, tels que le mélange xylaxine/kétamine (Cingolani et Kass, 2011; Roth et coll., 2002). Lors de nos expérimentations, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane, intubées et connectées à un ventilateur artificiel. Une thoracotomie a été réalisée par une incision au niveau du 3<sup>ème</sup> espace intercostal gauche de la souris. L'artère coronaire descendante gauche, une fois identifiée, est ligaturée 1 mm sous l'atrium gauche afin d'obtenir une région à risque (RAR) d'une taille constante représentant au total environ 50-60% de la taille du ventricule gauche (VG) total. La durée de l'ischémie déterminera l'étendue de la région infarctée (RI) (Tarnavski et coll., 2004). Dans notre étude, nous avons déterminé qu'une période d'ischémie de 30 min, que l'on retrouve couramment dans la littérature, (Borst et coll., 2011; Mersmann et coll., 2011; Sharif-Paghaleh et coll., 2017; Xu et coll., 2014) donne un infarctus global occupant environ 40-50% de la RAR. L'occlusion de la LAD est confirmée par l'observation d'un changement rapide de la couleur de la région à risque, qui devient pâle, dans les secondes qui suivent la

ligature. Après la période d'ischémie, le fil de la ligature est coupé afin de rétablir le débit sanguin dans la RAR du myocarde.



**Figure 40. L'artère coronaire antérieure descendante gauche**

LAD, artère coronaire antérieure descendante gauche. Le cœur de gauche montre bien la LAD, alors que le cœur de droite montre la ligature (flèche jaune) et l'absence de perfusion sanguine de la LAD. Figure modifiée et traduite de (Salto-Tellez et coll., 2004).



**Figure 41. Occlusion de l'artère coronaire antérieure descendante gauche**

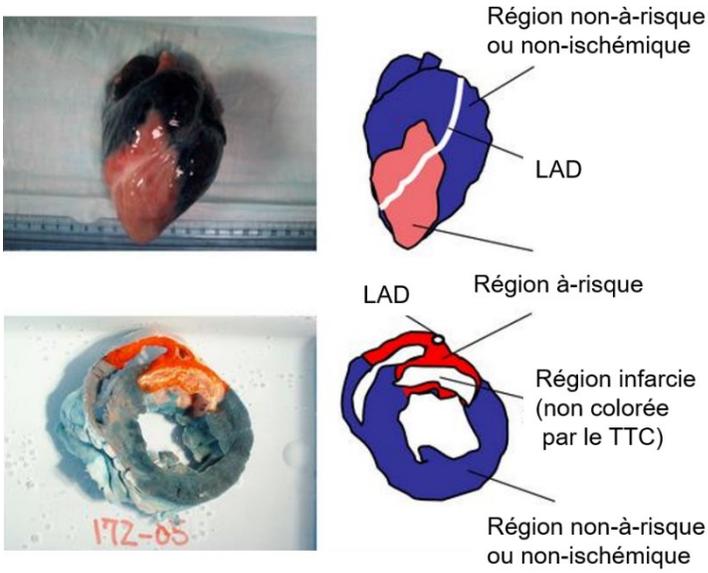
A) Ouverture du 3<sup>ème</sup> espace intercostal révélant l'atrium gauche (AG) et le ventricule gauche. B) Le péricarde est retiré afin de mieux voir l'AG (délimité par la flèche grise ►). La LAD (artère coronaire antérieure descendante gauche, pointée par les flèches noires →) est visible de l'extrémité de l'AG et se dirige vers l'apex. C) Passage de l'aiguille (pointée par les flèches bleues →) en dessous de la LAD à 1 mm sous l'AG. D) Le fil de nylon 8-0 suit l'aiguille. E) Formation d'un nœud. F) Un tube en silicone de 5 mm (entre les flèches vertes →) est placé entre le nœud et le cœur pour éviter de blesser le cœur en coupant le fil de nylon lors de la reperfusion. Figure modifiée de (Borst et coll., 2011).

La taille de l'infarctus est considérée comme étant la meilleure mesure scientifique pour évaluer les dommages au myocarde et interpréter l'efficacité d'un traitement (Bohl et coll., 2009). Contrairement à une occlusion permanente, la nécrose qui suit une I/RM est plus variable. Il faut donc distinguer trois zones dans le myocarde :

1. la région non à risque qui n'est pas affectée par l'occlusion de l'artère coronaire

2. la région à risque (RAR) qui n'est pas perfusée lors de l'occlusion de l'artère coronaire et qui représente le volume total de nécrose possible
3. la région infarctée (RI) qui représente la portion du tissu non viable dans la RAR

Pour obtenir ces trois régions, il faut procéder à une double coloration. D'abord, l'artère coronaire descendante gauche est soumise à nouveau à une occlusion par sa ligature à la fin de la période de reperfusion. Ensuite, le bleu d'Evans, un colorant hydrosoluble, est injecté dans la veine cave inférieure à une forte concentration (2%), perfusera le cœur et se liera aux cellules du myocarde en entrant dans l'espace extracellulaire (Saunders et coll., 2015; Yao et coll., 2018). Cela permet de colorer la région non à risque, sans toutefois affecter la RAR puisque la ligature empêche le colorant de circuler en aval de la ligature. Pour quantifier les différentes zones, il faut couper le cœur en tranches, puisque l'infarctus se développe à partir de la couche endocardiale et progresse vers le périmètre de la zone à risque et la région épocardique (Reimer et coll., 1977). Par la suite, les tranches sont incubées dans une solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC). Le TTC est incolore, mais forme un précipité rouge une fois réduit par les enzymes déshydrogénases en présence du co-facteur NADH (Bohl et coll., 2009; Nachlas et Shnitka, 1963). Les cellules nécrosées ne présentent aucune activité de ces enzymes ou les libèrent dans le milieu extracellulaire et ne peuvent donc plus réduire le TTC. Au final, la RI n'est pas colorée et donne une couleur rose très pâle tournant au blanc, tandis que la fraction de tissu viable dans la RAR est colorée en rouge (figure 42). La norme de référence généralement utilisée dans les publications pour mesurer la taille de l'infarctus est de présenter le ratio de RI/RAR (Bohl et coll., 2009; Heusch, 2016). Pour notre part, nous avons procédé à un temps de reperfusion de 48 heures pour mesurer la taille de l'infarctus de manière reproductible et mesurer certains paramètres biochimiques. Nous avons aussi fait des études à un moment plus précoce de la reperfusion, soit après 6 heures, afin de mesurer des paramètres biochimiques et métaboliques, la fonction contractile, l'inflammation et le stress oxydatif pour nous permettre d'étudier les mécanismes menant à la diminution de la taille de l'infarctus et à une amélioration de la fonction contractile du myocarde.



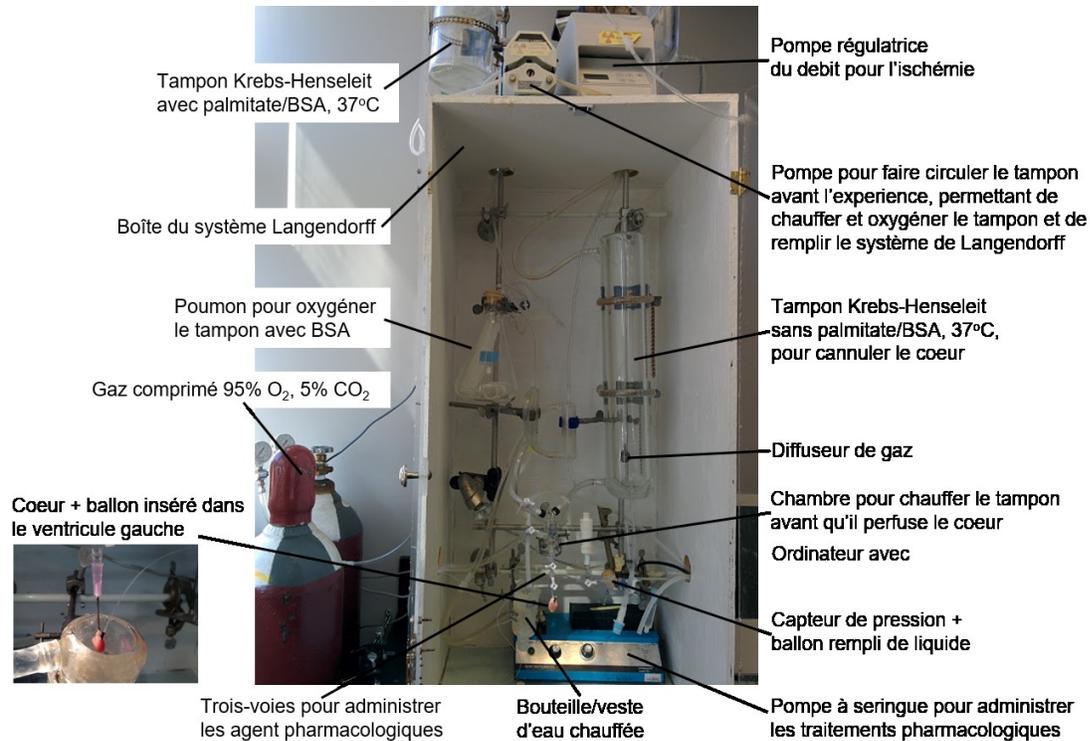
**Figure 42. Double coloration du myocarde par le bleu d'Evans et le TTC**

L'image du bas représente une tranche de cœur transversale sans avoir retiré le ventricule droit, montrant une partie de la région à risque et de la région infarctée globales. LAD, artère coronaire antérieure descendante gauche; TTC, chlorure de triphényltétrazolium. Figure traduite de (Suzuki et coll., 2011).

### 2.2.2.2 Cœur isolé en mode Langendorff

La méthode du cœur isolé en mode Langendorff a été inventée en 1895 afin de pouvoir manipuler avec précision la concentration des substrats énergétiques disponibles pour le cœur en corrélation avec la fonction contractile cardiaque (Taegtmeier, 1995). Avant de prélever le cœur, l'animal est anesthésié et de l'héparine est injectée i.v. afin de prévenir la formation de thrombus dans le cœur (Sambandam et coll., 1999). Une fois l'animal inconscient, le cœur est rapidement excisé et transféré dans une solution froide de tampon Krebs-Henseleit qui contient du NaCl 118 mM, du NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, du KCl 4,7 mM, du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, du CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, du MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, du glucose 11 mM, de l'insuline 8 nM, du lactate 1,5 mM, du pyruvate 0,2 mM, de l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) 0,5 mM et du pyruvate 0,2 mM. Le cœur est ensuite connecté au système de Langendorff par cannulation de l'aorte et perfusé de manière rétrograde avec du tampon Krebs-Henseleit supplémenté avec du palmitate 1,2 mM dans 2% d'albumine, à une température de 37°C, pH de 7,4 et oxygéné à 95% d'O<sub>2</sub>. Le cœur

étant perfusé avec des nutriments et de l'oxygène, il peut continuer à se contracter. Tout au long de la procédure, le cœur est maintenu dans une chambre dont la double-paroi contient de l'eau chauffée à 37°C afin de protéger le cœur contre les courants d'air et le froid et ainsi maintenir autour du cœur une température physiologique normale. L'insertion dans le ventricule gauche d'un ballon rempli de liquide connecté à un capteur de pression permet d'enregistrer en temps réel la fonction cardiaque (figure 43). Les avantages du système en mode Langendorff sont la facilité de reproduire l'évènement d'ischémie/reperfusion tout simplement en arrêtant le débit du tampon, de modifier les composantes du tampon (dans notre cas, nous y avons ajouté du palmitate, du lactate, du pyruvate et de l'insuline afin de nous rapprocher du métabolisme physiologique), d'administrer plusieurs traitements pharmacologiques directement au myocarde à différents temps, concentrations et de différentes durées et de pouvoir exclure les effets des organes en périphérie, de la circulation systémique et du système nerveux sur le myocarde (Herr et coll., 2015; Motayagheni, 2017). Il est aussi possible de perfuser le cœur à pression constante ou à un débit constant. Dans notre cas, nous avons opté pour une pression constante de 80 mmHg, ce qui permet au cœur de pouvoir réguler lui-même le débit de la perfusion en relation avec l'état de sa fonction cardiaque (Sutherland et Hearse, 2000).



**Figure 43. Système de Langendorff**

BSA, *bovine serum albumin*. Le système de Langendorff que nous avons utilisé et adapté appartenant au laboratoire de Yan Burelle.

### 2.2.3 Mesure des paramètres hémodynamiques et de la fonction cardiaque *in vivo*

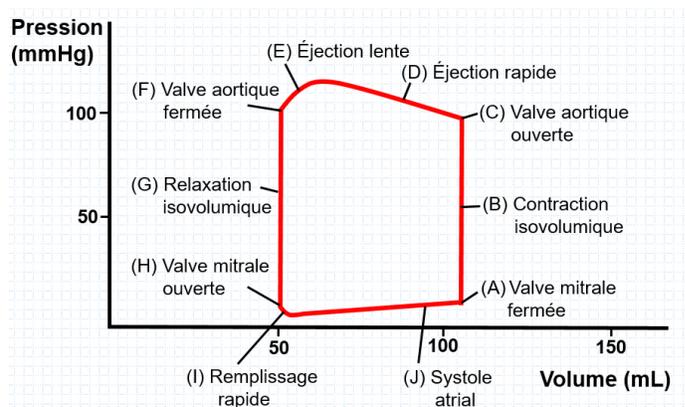
En 1989, Frank fut le premier à décrire le cycle de contraction ventriculaire sous forme de diagramme avec les valeurs de pression en ordonnée et de volume en abscisse (Jacob et Kissling, 1989). En 1914, le groupe de Starling a poussé davantage le concept de Frank et a observé une relation entre le volume lors du remplissage du ventricule et la quantité de sang éjectée (VE, volume d'éjection) lors d'une contraction. Il en a découlé la loi de Frank-Starling qui décrit que le myocarde est capable d'augmenter le VE en fonction d'une augmentation du volume de remplissage (pré-charge). En 1972, l'avancée technologique permettant l'enregistrement continu de la pression et du volume du ventricule a permis à Suga et Sakawa

de déduire d'autres paramètres, tels que la contractilité et la post-charge, à partir des graphiques de pression-volume (PV) (Sagawa, 1978; Suga et Sagawa, 1974).

Le développement de cathéters de conductance a permis de mesurer avec précision la pression et le volume en temps réel (Baan et coll., 1984). Le cathéter utilisé chez la souris possède deux paires d'électrodes et un capteur de pression au centre. Lorsque le cathéter est inséré dans le ventricule, les deux électrodes aux extrémités émettent un courant constant à haute fréquence et génèrent un champ électrique qui traverse le sang, la paroi musculaire et les structures environnantes et qui diminue en s'éloignant. La conductance est le courant appliqué divisé par le voltage (différence de potentiel) mesuré par les deux électrodes du centre. La conductance va varier selon le volume de sang qui entre et qui sort lors des contractions cardiaques et qui applique une résistivité contre le courant électrique. La conductance appliquée par la paroi musculaire est essentiellement constante et est appelée la conductance parallèle. Pour obtenir les valeurs de volume absolu, il faut mesurer la résistivité du sang de l'animal dans un volume précis (cuvette) et la valeur de conductance parallèle. La conductance parallèle est mesurée en injectant un bolus de saline hypertonique qui fera augmenter la conductivité du sang. On observe alors une augmentation des valeurs de volumes en fin de systole (VTS, volume télésystolique) et en fin de diastole (VTD, volume télédiastolique), mais la conductance parallèle demeure constante. Lorsqu'on trace un graphique de VTS vs. VTD, on peut extrapoler la pente jusqu'à ce que la courbe croise « la ligne d'identité ». La ligne d'identité a une pente de 1, ce qui correspond à un VTS égal à un VTD et à une conductance du sang égale à 0 dans le ventricule. Le volume à cette interception de la courbe du bolus avec la ligne d'identité représente la conductance mesurée de la paroi musculaire. La conductance parallèle est soustraite de la conductance enregistrée lors de l'expérience pour corriger les volumes en valeurs absolues (Steendijk et coll., 2001).

La boucle de pression-volume inclut tous les événements d'un cycle cardiaque (figure 43). La systole est représentée par les côtés droit et supérieur de la boucle, à partir du moment où la valve mitrale se ferme lorsque la pression de remplissage du ventricule gauche dépasse la pression de l'atrium gauche (A). La pression commence ensuite à augmenter lors du couplage d'excitation-contraction systolique, ce qui fait augmenter la tension murale du myocarde tout

en maintenant un volume constant (contraction isovolumique) (B). Lorsque la pression du ventricule gauche dépasse la pression aortique, la valve aortique s'ouvre (C) et le sang est éjecté. L'éjection rapide du sang cause une diminution du volume ventriculaire, mais la pression continue à s'élever légèrement jusqu'à ce que la force systolique maximale soit atteinte (D). La pression du ventricule gauche commence alors à diminuer avec une éjection sanguine plus lente jusqu'au point où la pression du ventricule gauche n'excède plus la pression de la valve aortique, causant sa fermeture (E). La diastole commence alors par une phase de relaxation isovolumique (F). Lorsque la pression du ventricule gauche diminue au point d'être inférieure à la pression de l'atrium gauche, la valve mitrale s'ouvre (G). Le ventricule gauche commence alors à se remplir, accompagné d'une légère augmentation de la pression du ventricule gauche (H), jusqu'à ce que sa pression excède celle de l'atrium gauche qui se referme alors (A). Le graphique de pression-volume permet l'identification rapide des valeurs importantes de pression et de volume en fin de systole, lorsque la valve aortique se ferme (E), et en fin de diastole, lorsque la valve mitrale se ferme (A). Le volume d'éjection est aussi facilement représenté par la différence du volume en fin de diastole (VTD) et du volume en fin de systole (VTS), qui correspond à la longueur de la boucle. Le débit cardiaque (DC) est calculé par le produit du VE et de la fréquence cardiaque. La fraction de sang éjecté lors de la systole (fraction d'éjection) est calculée par le ratio entre le volume d'éjection et le VTD, qui se situe normalement entre 50-60%. L'aire dans la boucle de PV représente le travail systolique (TS) calculé par le produit du VE et de la pression artérielle moyenne.



**Figure 44. Boucle de pression-volume**

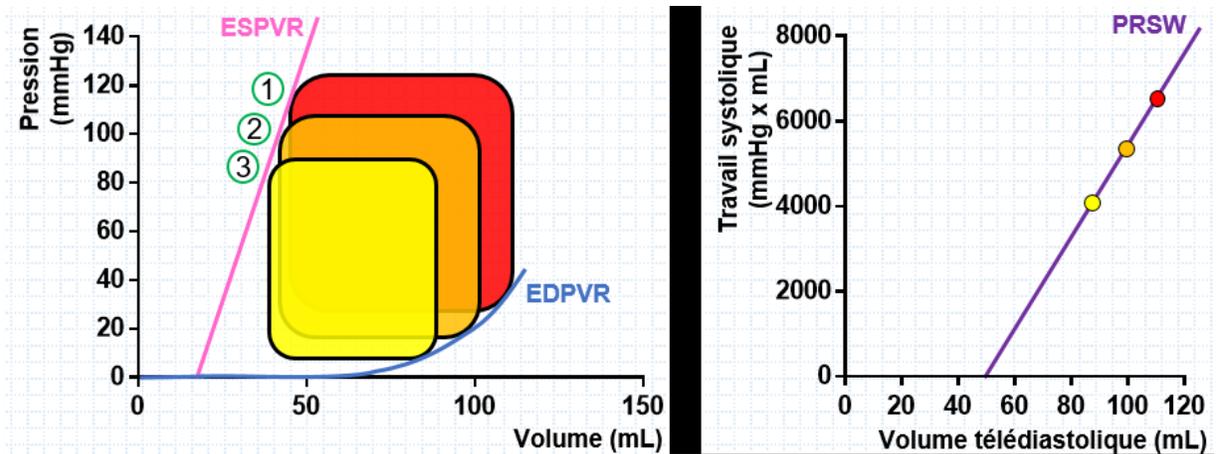
Évènements d'un cycle cardiaque représentés sous la forme d'une boucle de pression-volume.

Les techniques d'échocardiographie (Pistner et coll., 2010; Suehiro et coll., 2001), de SPECT (*single photon emission computed tomography*) (Roelants et coll., 2012) et de MRI (*magnetic resonance imaging*) (Flogel et coll., 2008) permettent de mesurer la morphologie et la fonction cardiaque de manière non-invasive. Toutefois, ces techniques sont limitées à des mesures de la fonction du myocarde lors d'un état d'équilibre (*steady-state*) avec des paramètres qui sont influencés par les charges et dont les résultats manquent de spécificité du ventricule en tant que tel. Le principal avantage des boucles de PV obtenues par un cathéter de conductance est la mesure de la contractilité ventriculaire (inotropisme) de manière indépendante des conditions de charges et de la fréquence cardiaque.

Le sarcomère est l'unité de base structurale de la contraction dans les muscles striés stimulés. Quand le ventricule gauche est vide et qu'il se remplit, la longueur des sarcomères passe de 1,9 à 2,2  $\mu\text{m}$  (Julian et Sollins, 1975; Spotnitz et coll., 1966). Lorsque le ventricule gauche se remplit, les sarcomères au centre du myocarde sont les premiers à s'allonger, puis les sarcomères dans les couches sous-endocardiale et sous-épicardiale s'allongent (Yoran et coll., 1973). Les changements de longueur des sarcomères permettent au myocarde de répondre à l'augmentation du volume de remplissage et également à maintenir sa capacité d'éjection de ce volume de sang. Le degré de contraction du ventricule gauche va déterminer le volume d'éjection et sera influencé par trois facteurs : la pré-charge, la post-charge et la contractilité. La pré-charge est la charge sur les cardiomyofibres juste avant la contraction, représentée par le VTD. Une augmentation de la pré-charge entraîne l'étirement de plus de sarcomères et donc plus de sarcomères vont se contracter lors de l'éjection du sang avec une PTS (pression téléstolique) plus élevée. Toutefois, le VG maintient toujours une fraction d'éjection de 50%, ce qui fait que l'augmentation du VTS est relativement moindre que l'augmentation correspondante du VTD. La post-charge, quant à elle, inclut tous les facteurs qui s'opposent à la contraction des fibres musculaires. Le sang est éjecté de manière pulsatile dans l'aorte et se déverse ensuite dans les vaisseaux systémiques. Une augmentation de la rigidité (élastance) des vaisseaux, de la constriction des vaisseaux (RVS, résistance vasculaire systémique), de la viscosité du sang et de la fréquence cardiaque augmentent toutes la post-charge. La contractilité est la capacité des sarcomères à se contracter de manière intrinsèque et à développer une

pression nécessaire pour éjecter le sang. La contractilité ne dépend pas des conditions de pré-charge et de post-charge. Pour la mesurer, il faut regarder la relation entre la pression et le volume. Pour ce faire, une occlusion de la veine cave inférieure est effectuée, ce qui diminue la pré-charge, faisant ainsi varier la pression télé-systolique. En traçant une ligne qui relie toutes les pressions télé-systoliques en fonction du changement du volume télé-diastolique (Figure 44), on obtient une droite qui est connue comme étant la relation de pression-volume en fin de systole (ESPVR, *end systolic pressure volume relationship*) (Baan et coll., 1992; Sagawa, 1978). La pente de cette droite représente la contractilité, ou l'inotropisme, du ventricule, tandis que son intersection sur l'axe des abscisses ( $V_0$ ) représente le volume minimal requis pour générer une pression. Le  $V_0$  a une valeur positive et est relativement petit en condition physiologique puisqu'il représente un volume qui ne peut pas faire partie du VE lors d'une contraction. La pente du ESPVR est appelée Ees pour élastance en fin de systole (*end-systolic elastance*) et représente le changement de pression en fonction d'un changement de volume dans le ventricule. Une autre méthode pour mesurer la contractilité est de mesurer la relation entre le travail systolique en fonction du volume télé-diastolique (PRSW, *preload recruitable stroke work*) qui est linéaire (Glomer et coll., 1985). Les avantages du PRSW sont l'intégration des données du cycle cardiaque en entier, une meilleure reproductibilité que l'Ees, une pente stable sur une plus grande étendue de VTD, un  $V_0$  plus constant et le fait que les valeurs de volumes s'annulent éliminant ainsi les erreurs de calibration du volume (Cingolani et Kass, 2011; Rahko, 1994). L'occlusion de la veine cave inférieure permet aussi d'observer la relation entre la pression et le volume diastolique. Les boucles de pression-volume sont déplacées vers la gauche, avec une chute de pression un peu plus rapide au début et qui devient linéaire au fur et à mesure que la pré-charge diminue. Cette courbe représente la EDPVR (*end diastolic pressure volume relationship*) qui montre une diminution de la compliance (ou une augmentation de l'élastance) du ventricule gauche lorsqu'il se remplit. On peut aussi le représenter par sa réciproque qui est une augmentation de l'élastance. Quels que soient les changements de charges, les valeurs de PTS et de PTD des boucles de PV tomberont toujours sur les courbes de ESPVR et de EDPVR qui font d'eux des paramètres pour mesurer la contractilité. Pour altérer la contractilité, il faut changer la quantité de calcium relâchée dans les myofilaments, changer l'affinité des myofilaments pour le calcium ou altérer le nombre de myofilaments disponibles pour participer

au processus de contraction. Toutes ces conditions sont observées pendant la pathologie de l'I/RM et encourage la mesure de la contractilité par l'analyse de boucles de PV.



**Figure 45. Boucles de pression-volume lors d'un changement de la pré-charge**

L'occlusion de la veine cave inférieure diminue le volume de remplissage (pré-charge), ce qui cause un décalage des boucles vers la gauche (de 1 vers 3). Ceci permet de déterminer les paramètres de contractilité (ESPVR, *end-systolic pressure–volume relation*) et d'élastance (EDPVR, *end-diastolic pressure–volume relation*). La relation entre le travail systolique et le volume télédiastolique pour chaque battement donne la droite du PRSW (*preload recruitable stroke work*), un autre paramètre de contractilité.

## **Chapitre 3: RÉSULTATS**

### **3.1 Première étude: Adiponectin has a pivotal role in the cardioprotective effect of CP-3(iv), a selective CD36 azapeptide ligand, after transient coronary artery occlusion in mice**

**Article publié dans FASEB J. 32(2):807-818 (2018)**

David N. Huynh<sup>1†</sup>, Valérie L. Bessi<sup>1†\*</sup>, Liliane Ménard<sup>1†</sup>, Jérôme Piquereau<sup>1‡</sup>, Caroline Proulx<sup>2†</sup>, Maria Febbraio<sup>3</sup>, William D. Lubell<sup>2</sup>, André C. Carpentier<sup>4</sup>, Yan Burelle<sup>1δ</sup>, Huy Ong<sup>1</sup> and Sylvie Marleau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, <sup>2</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, Québec, Canada; <sup>3</sup>Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Alberta, Canada; <sup>4</sup>Department of Medicine, Division of Endocrinology, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

<sup>†</sup>contributed equally to this work

Present addresses:

<sup>‡</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Université Paris-Sud 11, France.

<sup>†</sup>Department of Chemistry, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.

<sup>δ</sup>Department of Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Ontario, Canada.

\*Correspondence to Valérie Lafrenière Bessi, PhD or Sylvie Marleau, PhD, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7. Tel: 514-343-7110; Fax: 514-343-2102.

E-mail [valerie.lafreniere.bessi@umontreal.ca](mailto:valerie.lafreniere.bessi@umontreal.ca) or [sylvie.marleau@umontreal.ca](mailto:sylvie.marleau@umontreal.ca)

Short title: CP-3(iv) is cardioprotective through adiponectin

## **Contribution des auteurs**

### **David N. Huynh**

Partie expérimentale (figure 1, 2, 3 et 4; tableau 1), participation à l'analyse des résultats, conceptualisation du projet, validation du modèle expérimental *ex vivo*, écriture du manuscrit, réalisation et analyses statistiques, illustration des résultats

### **Valérie L. Bessi**

Partie expérimentale (figure 1, 2, et 3; tableau 1), analyse des résultats, conceptualisation du projet, validation du modèle expérimental *in vivo*

### **Liliane Ménard**

Partie expérimentale (figure 1, 2, 3 et 4; tableau 1), analyse des résultats, conceptualisation du projet, validation du modèle expérimental *ex vivo*, révision du manuscrit

### **Jérôme Piquereau**

Partie expérimentale concernant la dissection et l'isolation des fibres perméabilisées (figure 3C) et révision du manuscrit

### **Caroline Proulx**

Synthèse de l'azapeptide CP-3(iv) et révision du manuscrit

### **Maria Febbraio**

Donation des souris déficientes en CD36, échanges de discussion et révision critique du manuscrit

### **William D. Lubell**

Conceptualisation des azapeptides et révision critique du manuscrit

### **André C. Carpentier**

Implication dans la conceptualisation du projet et révision critique du manuscrit

### **Yan Burelle**

Conceptualisation des expériences liées aux mitochondries (figure 3C) et du cœur isolé en mode Langendorff (figure 4)

### **Huy Ong**

Conceptualisation du projet et révision critique du manuscrit

### **Sylvie Marleau**

Conceptualisation du projet et analyse des résultats et écriture majeure du manuscrit

## RÉSUMÉ

Objectif. Le CD36 est un récepteur qui possède de multiples ligands et qui est impliqué dans le métabolisme des lipides. Nous avons investigué les mécanismes impliqués dans les effets cardioprotecteurs du CP-3(iv), un azapeptide appartenant à une nouvelle classe de ligands sélectifs envers le CD36. Le rôle du CP-3(iv) à médier la cardioprotection a été investigué parce que la signalisation du CD36 conduit à l'activation du récepteur de type gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes, un régulateur transcriptionnel de l'adiponectine.

Méthodes et résultats. Le prétraitement avec le CP-3(iv) a réduit la taille de l'infarctus de 54% et a préservé l'hémodynamique chez les souris C57BL/6 soumises à une ligature de l'artère coronaire pendant 30 min et d'une reperfusion mais n'a aucun effet chez les souris déficientes en CD36. Les effets du CP-3(iv) ont été associés à une augmentation des taux circulants de l'adiponectine et de l'expression du gène de l'adiponectine et de ses régulateurs transcriptionnels (*Pparg*, *Cebpb*, *Sirt1*) dans le gras épidydimaire après 6 h de reperfusion. Une diminution du stress oxydatif et de l'apoptose dans le myocarde ont été observées, ainsi qu'une augmentation de l'expression des protéines cibles de l'adiponectine, incluant la cyclooxygénase-2, l'AMPK phosphorylée et l'Akt phosphorylée. De plus, le CP-3(iv) a augmenté la performance du myocarde dans les cœurs isolés, alors qu'une neutralisation de l'adiponectine avec un anticorps anti-adiponectine l'a abrogé.

Conclusion. Le CP-3(iv) exerce une cardioprotection contre les dommages et la dysfonction liés à l'ischémie et à la reperfusion du myocarde, du moins en partie, en augmentant les taux d'adiponectine en circulation et dans le myocarde. Par conséquent, les effets paracrine et endocrine de l'adiponectine peuvent contribuer à la diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'apoptose suite à une ischémie/reperfusion du myocarde, de manière dépendante du CD36.

Mots-clés : Ischémie/reperfusion; espèces réactives de l'oxygène; PPAR $\gamma$ ; Langendorff; hémodynamique

## ABSTRACT

**Aims.** CD36 is a multiligand receptor involved in lipid metabolism. We investigated the mechanisms underlying the cardioprotective effect of CP-3(iv), an azapeptide belonging to a new class of selective CD36 ligands. The role of CP-3(iv) in mediating cardioprotection was investigated because CD36 signaling leads to activation of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$ , a transcriptional regulator of adiponectin.

**Methods and Results.** CP-3(iv) pretreatment reduced infarct size by 54% and preserved hemodynamics in C57BL/6 mice subjected to 30 min coronary ligation and reperfusion, but had no effect in CD36-deficient mice. The effects of CP-3(iv) were associated with an increase in circulating adiponectin levels, epididymal fat adiponectin gene expression, and adiponectin transcriptional regulators (*Pparg*, *Cebpb*, *Sirt1*) after 6 h of reperfusion. Reduced myocardial oxidative stress and apoptosis were observed along with an increase in expression of myocardial adiponectin target proteins, including COX-2, phospho-AMPK and phospho-Akt. Moreover, CP-3(iv) increased myocardial performance in isolated hearts, while the blockade of adiponectin with an anti-adiponectin antibody abrogated it.

**Conclusions.** CP-3(iv), a CD36 ligand, exerts cardioprotection against MI/R-injury and dysfunction at least in part by increasing circulating and myocardial adiponectin levels. Hence, both paracrine and endocrine effects of adiponectin may contribute to reduce reactive oxygen species generation and apoptosis after MI/R, in a CD36-dependent manner.

**Key words:** ischemia/reperfusion; reactive oxygen species; PPAR- $\gamma$ ; Langendorff; hemodynamics

## INTRODUCTION

Despite substantial decline in mortality rates from cardiovascular diseases (CVD) and stroke over the last decades, ischemic heart disease (IHD) remains the leading cause of death in developed countries (1) and is expected to burden global healthcare in the future (2).

Altered myocardial metabolism plays a central role in the pathogenesis of IHD. Interruption of myocardial energy supply triggers anaerobic glycolysis to maintain energy requirements, yet the benefits are limited by the formation of byproducts and ionic perturbations which may lead to contractile dysfunction and cell death (3). Aerobic reperfusion of ischemic hearts, although necessary for myocardial salvage, may further jeopardize function (4). Indeed, reperfusion may lead to myocardial contractile dysfunction, microvascular and endothelial cell injury and cell death (4). Increased production of reactive oxygen species (ROS), intracellular calcium overload and altered myocardial metabolism are causal events in the setting of myocardial ischemia and reperfusion (MI/R).

MI/R stimulates the sympatho-adrenal system and catecholamine-induced lipolysis, which gives rise to an increased availability of nonesterified fatty acid (NEFA). Elevated circulating NEFA, in turn, drives myocardial fatty acid uptake and oxidation that may impact negatively on glucose utilization as fuel for oxidative metabolism (5). Therapeutic avenues aiming to promote glucose utilization following reperfusion may improve myocardial functional recovery (6, 7). Alternatively, timely interventions to modulate myocardial fatty acid oxidation (FAO), either by blocking fatty acid transport to cardiomyocytes or by directly targeting mitochondrial beta-oxidative processes, offer potential for adjusting cardiac energy metabolism (8). A key player in regulating myocardial NEFA uptake is the transmembrane glycoprotein cluster of differentiation 36 receptor [CD36, scavenger receptor B2 (SR-B2)], which is a multiligand, broadly expressed protein involved in immunity and metabolic homeostasis (9). A central role for CD36 in cardiac dysfunction related to lipid uptake and handling has been reported in metabolic disorders such as type 2 diabetes and obesity (10). CD36 deletion was shown to improve functional recovery of cardiomyocyte-specific CD36-knockouts (KO) (11) and to attenuate myocardial damage in the global CD36-KO (12). In

addition to regulating long chain fatty acid (LCFA) transport to the heart, CD36 was shown to play an important role in regulating LCFA flux to other tissues, such as white adipose tissue, in which CD36 deficiency is associated with increased basal lipolysis (13). Beneficial cardioprotective effects may result from a drug that can reduce elevated lipolysis, which is one of the deleterious consequences of MI/R.

In light of this background, we showed previously that pretreatment with a synthetic hexapeptide of the growth hormone-releasing peptide (GHRP) family exerted cardioprotective effects by targeting the CD36 receptor in a mouse model of MI/R (12). The cardioprotective effects of EP 80317, a GHRP-6 derivative, were associated with reduced myocardial fatty acid uptake, along with reduced NEFA mobilization from adipose tissue, indicating the potential for targeting CD36 for the treatment of ischemic cardiomyopathy (12). A major drawback of GHRP-6 derivatives for cardiovascular indication is, however, their limited selectivity towards CD36, because many peptide analogs bind the ghrelin receptor, previously known as the growth hormone secretagogue receptor-1a (GHSR-1a). To address this limitation, our group has synthesized a novel series of azapeptide ligands of CD36, of which CP-3(iv) (Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), an azaPhe<sup>4</sup> analog of GHRP-6, maintained affinity to the CD36 receptor without binding the GHS-R1a receptor (IC<sub>50</sub> >> 10<sup>-5</sup> M) (14).

CD36 regulates the expression and circulating concentrations of adiponectin, a PPAR- $\gamma$  responsive hormone by regulating LCFA fluxes and fatty acid-dependent peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$  activation (15). Our previous studies pointed to an important role of CD36 ligands in reducing NEFA mobilization from adipose tissue (12). We hypothesized that adiponectin, a major cardioprotective adipokine that exerts anti-lipolytic action and reduces circulating NEFA (16), may be a key player in the preservation of cardiac function by CD36 ligands. Furthermore, adiponectin-deficient mice exhibited enhanced MI/R-induced injury (17), whereas exogenous or endogenously-derived adiponectin regulates myocardial anti-apoptotic, anti-oxidant and metabolic pathways [reviewed in (18)].

The present study aimed to investigate the role of adiponectin in the cardioprotective effects of the azapeptide CP-3(iv) during myocardial ischemia/reperfusion.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Four-month-old male CD36<sup>+/+</sup> and CD36-deficient (CD36<sup>-/-</sup>) mice were obtained and used as previously described (12). All animal experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee, in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (no: 85-23).

### **Ischemia-reperfusion of the left descending coronary artery bed**

Left coronary artery ligation (LCAL) was performed as described previously (12) on 4-month-old male mice assigned randomly to the different experimental groups. Mice were either pretreated by daily subcutaneous injections of CP-3(iv) (289 nmol/kg) or vehicle (0.9% NaCl) over 14 days, or received an acute administration of increasing doses of CP-3(iv) (289-1000 nmol/kg) 10 min prior to reperfusion. The last doses following repeated administrations were given 30 minutes before exposure to 30 min LCAL. After 6 or 48 h of reperfusion, animals were anesthetized with isoflurane and euthanized by exsanguination. An additional dose of CP-3(iv) was administered 24 h after reperfusion in mice sacrificed at 48 h. Sham-operated mice underwent the identical procedure without placement of the ligature.

### **Determination of the infarct area and area-at-risk**

Infarct area (IA) was determined following Evans blue injection as described previously (12). LV area, area-at-risk (AAR), and IA were determined by computerized planimetry and normalized to the weight of each slice. AAR/LV, IA/LV and IA/AAR were expressed as percentages.

### **Myocardial hemodynamics**

LV indices were derived from pressure-volume (PV) measurements in isoflurane-anesthetized mice at 48 h after reperfusion using a miniaturized PV conductance catheter (SPR-839, Millar Instruments, Houston, TX, USA), as previously described (12). Briefly, PV signals were

recorded from the conductance catheter inserted in the LV apex at steady state, and during transient reduction of cardiac preload by inferior vena cava occlusion. Conductance data were converted to calibrated volume using heparinized mouse blood at 37°C and corrected for the parallel conductance, determined by the hypertonic saline dilution method. Real-time signals were processed with IOX2 software (EMKA Technologies Inc., Falls Church, VA, USA) to determine hemodynamic parameters.

### **Preparation of permeabilized myofiber bundles from LV and measurement of ROS production**

Permeabilized myofiber bundles from LV were prepared as previously described (19). Briefly, under a microscope, cardiac fibers were finely dissected from the endocardial surface of the LV in 50 mM potassium-methanesulfonate (K-MES), pH 7.3, supplemented with 2.77 mM CaK<sub>2</sub>EGTA, 7.23 mM K<sub>2</sub>EGTA, 6.56 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM taurine, 0.5 mM dithiothreitol, 20 mM imidazole, 5.3 mM Na<sub>2</sub>ATP and 15 mM phosphocreatine and permeabilized with 50 µg/mL saponin for 30 min at 4°C with continuous shaking. The effect of CP-3(iv) on 5 µM succinate-induced mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was measured in saponin-permeabilized muscle fibers with the fluorescent probe Amplex Red (1 µM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 1.2 U/mL horseradish peroxidase in 110 mM K-MES buffer pH 7.3 at 37°C containing 35 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O and 0.5 mg/mL BSA. A standard curve was used to determine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels.

### **Detection of reactive oxygen species by chemiluminescence**

NADPH oxidase mediated superoxide anion production in LV homogenates was induced in the presence of 300 µM NADPH (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, On, Canada) and 5 µM lucigenin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, On, Canada) at 37°C using a lumi-aggregometer (Chronolog Corporation, Havertown, PA, USA). Diphenyleneiodonium was used to inhibit NADPH oxidase activity. Peak chemiluminescence amplitude was normalized to protein concentrations and blood leukocyte counts.

### **Adiponectin and cardiac troponin I ELISA**

Plasma cardiac troponin I levels were determined by ELISA (Life Diagnostics Inc., West Chester, PA, USA). HMW adiponectin isoform and total adiponectin concentrations were measured in plasma with or without protease treatment, which specifically digests MMW and LMW isoforms, using the ELISA kit from Alpco Diagnostics (Salem, NH). Total adiponectin concentration in LV homogenates was assayed using the ELISA kit from R&D Systems (Minneapolis, MN).

### **Activity of caspases and aconitase**

Caspase-3 activity in LV homogenates (5 µg protein) was measured by cleavage of the fluorogenic Ac-DEVD-AFC substrate (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) and expressed in relative fluorescence units (RFU) per second (19). Aconitase activity was assessed in mitochondrial fractions (0.04 mg proteins/mL) from LV homogenates as the rate of NADP reduction by isocitrate dehydrogenase (1 U/mL) in 100 µM Tris-HCl buffer in the presence of 0.5 mM NADP<sup>+</sup>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM sodium citrate (20). Aconitase activity was expressed as mU NADPH produced per µg protein.

### **Real-time PCR**

Total RNA was extracted from epididymal fat using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen Inc., Toronto, On, Canada), treated with DNase I (Thermo Scientific Ottawa, On, Canada), and reverse-transcribed to cDNA. Real-time PCR was performed using the Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, San Francisco, CA, USA) with the SYBR Green protocol and specific primers of genes, including nuclear factor (erythroid-derived 2) (*Nrf2*), *Cd36*, adiponectin (*Adipoq*), sirtuin 1 (*Sirt1*), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*Pparg*), CCAAT/enhancer binding protein beta (*Cebpb*), cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase encoding gene 1 (*Pck1*) and fatty acid transport protein 1 (*Fatp1*), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) as an internal control. Relative gene expression was calculated using the comparative Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method. Primer sets used in this study are listed in Table 1.

### **Western blotting**

Immunoblots of LV Akt, phosphoSer473-Akt (p-Akt), acetyl-CoA carboxylase (ACC), phosphoSer79-ACC (p-ACC), 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, phosphoThr172-AMPK (p-AMPK) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), cyclooxygenase-2 (COX-2) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), cytochrome c (BD Biosciences, Mississauga, On, Canada), CD36 (Novus Biologicals, Oakville, ON, Canada) and mouse  $\alpha$ -tubulin (Abcam, Toronto, On, Canada) were performed as described previously (12). The signal was quantified with ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA).

### **Langendorff setup and protocol**

Hearts from anesthetized (600 mg/kg chloral hydrate and 10 mg/kg xylazine) and heparinized (5000 U/kg, i.p.) male CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup> mice were rapidly excised and immersed in ice-cold Krebs-Henseleit bicarbonate (KHB) buffer containing 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, 8 nM insulin, 1.5 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, 0.5 mM EDTA and 0.2 mM pyruvate. After pericardial fat removal, the aorta was cannulated with an 18-gauge cannula, and the heart was perfused retrogradly in a non-recirculating mode at a constant perfusion pressure of 80 mmHg with KHB buffer supplemented with 1.2 mM palmitate in 2% fatty acid-free BSA and gassed with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Hearts were subjected to 30 min of aerobic perfusion followed by 40 min of low-flow ischemia (10% of pre-ischemic flow) and 10 min of reperfusion. CP-3(iv) and rabbit anti-adiponectin polyclonal antibody or control IgG (Abcam, Toronto, On, Canada) were added throughout reperfusion (10 min) via an *infusion pump through a side port directly above the aortic cannula at final concentrations of 1  $\mu$ M and 0.3  $\mu$ g/mL, respectively.* Contractile function was monitored continuously by means of a fluid-filled balloon inserted in the LV connected to a pressure transducer. Ventricular pressures and heart rate were recorded with a PowerLab/8sp instrument and analyzed with *Chart v5.0.1 software (ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA)*. Coronary effluent was collected at different time intervals for measurements of coronary flow and the determination of LDH release. At the end of reperfusion, hearts and perfusates were immediately frozen on dry ice and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for latter assessment of adiponectin levels.

## Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed on normally distributed data using one or two-way ANOVA and Student-Newman-Keuls (SNK) post-hoc test (Statistica 8, StatSoft, Tulsa, OK, USA) or unpaired *t*-test (Prism, GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA), unless indicated otherwise. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### CP-3(iv) pretreatment decreases myocardial injury and preserves LV function in a murine model of MI/R

Age-matched male CD36<sup>-/-</sup> and CD36<sup>+/+</sup> mice were pretreated with CP-3(iv) (289 nmol/kg) or vehicle (0.9% NaCl) for 14 days, and subjected to 30 min of LCAL caused by the proximal occlusion of the left anterior descending coronary artery, followed by reperfusion for 6 or 48 h (Fig. 1A). We first investigated the cardioprotective effect of the azapeptide CP-3(iv) at a dose equimolar to that previously shown by EP 80317, a first generation CD36 ligand, to exert cardioprotective effect in experimental MI/R (12). Representative images of triphenyltetrazolium chloride (TTC)-stained left mid-ventricular cross-sections of CD36<sup>+/+</sup> mice are shown in Fig. 1B. Transient LCAL led to the development of a consistently large myocardial AAR (slightly more than 50% LV) in both 0.9% NaCl vehicle- and CP-3(iv)-pretreated CD36<sup>+/+</sup> mice (Fig. 1C, left side panel). Prophylactic administration of CP-3(iv) significantly reduced IA to LV and *IA to AAR ratios* (Fig. 1C, middle and right side panel) by 56% and 54% respectively, along with reduced levels of cTnI, from  $0.15 \pm 0.03$  to  $0.09 \pm 0.01$  ng/mL (Fig. 1D). In contrast, analyses of LV *photomicrograph cross-sections* from CD36<sup>-/-</sup> mice, with *or without* CP-3(iv) pretreatment (Fig. 1E), showed no change in IA/LV and IA/AAR ratios (Fig. 1F). Acute administration of CP-3(iv) 10 min prior to reperfusion was associated with a dose-dependent reduction of IA/LV, with the highest dose tested (1000 nmol/kg) reducing infarct area by 44% compared to vehicle-treated CD36<sup>+/+</sup> mice (Fig. 1G).

In parallel studies, hemodynamic parameters and indices of systolic and diastolic function were determined using conductance catheter-derived PV relationship after pretreatment with the drug for 14 days. As shown in Table 2, CP-3(iv) did not significantly modulate systolic and diastolic parameters in sham-operated CD36<sup>+/+</sup> mice compared to vehicle (0.9% NaCl)-treated group. As anticipated, systemic hemodynamics were largely impaired following MI/R in vehicle-exposed mice, with reduced stroke volume (SV) and cardiac output (CO) and increased systolic vascular resistance (SVR) compared to sham-operated mice. Systolic LV dysfunction was evidenced by reduced ejection fraction (EF), stroke work (SW) (48%) and preload recruitable stroke work (PRSW) (23%, a load-independent indice of contractility) at 48 h post reperfusion. Pretreatment with CP-3(iv) improved LV hemodynamics, as indicated by an increase in SV (36%), CO (40%), SW (49%) and PRSW (44%).

### **CP-3(iv) pretreatment increases adiponectin circulating levels and adipose tissue gene expression after MI/R**

We investigated the potential role of adiponectin in CP-3(iv)-induced cardioprotection. Our results show that after 14 days of pretreatment, high molecular weight (HMW) plasma adiponectin, and to a lesser degree total plasma adiponectin levels, were raised transiently at 6 h post reperfusion in CP-3(iv)-pretreated mice, by 35% and 13%, respectively (Fig. 2A, B), whereas no changes were observed at 48 h after initiating reperfusion (Fig. 2C, D). At this earlier (6 h) time point after reperfusion, an upregulation of *Adipoq* mRNA levels and of adiponectin upstream regulators (*Pparg*, *Cebpb*, *Sirt1*) and of PPAR- $\gamma$  target genes (*Pck1*, *Fatp1*, *Nrf2*, *Cd36*) was observed in epididymal adipose tissue in CP-3(iv)-pretreated CD36<sup>+/+</sup> mice (Fig. 2E). In contrast, no change in adiponectin circulating levels was observed in CD36<sup>-/-</sup> mice treated with CP-3(iv) at either time point (Fig. 2F-I), nor was there change in the expression of selected *epididymal fat depot genes* (Fig. 2J). Along with these observations, we found that NEFA plasma levels were decreased by 33%, from 0.36 to 0.24 ( $\pm$  0.03) mM in CP-3(iv)-pretreated CD36<sup>+/+</sup> mice; no change was observed in CD36<sup>-/-</sup> mice (0.51  $\pm$  0.02 in 0.9% NaCl- and 0.47  $\pm$  0.03 mM in CP-3(iv)-pretreated mice).

### **CP-3(iv) pretreatment reduces myocardial ROS formation following transient LCAL**

Considering the potent anti-oxidative activities of adiponectin, we explored the effect of repeated CP-3(iv) administrations on myocardial oxidative stress. Our results showed a striking reduction, by 51%, of NADPH-stimulated superoxide anion production in LV homogenates of CP-3(iv)-treated mice at 6 h post reperfusion (Fig. 3A), but not in CD36<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3B), and, to a lesser degree, of mitochondrial-derived ROS, as assessed by succinate-stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation in saponin-*permeabilized cardiac fibers* (20%) (Fig. 3C). Consistent with these observations, *the activity of the ROS-sensitive mitochondrial enzyme aconitase was preserved* (Fig. 3D). The effects of CP-3(iv) on AMPK- and COX-2-dependent mechanisms were assessed because of their relevance as main modes of myocardial adiponectin action (17). Our results show an increase in COX-2 protein expression by 22% (Fig. 3E) and an augmentation of the relative ratio of p-Thr172-AMPK to total AMPK by 25% (Fig. 3F). In addition, a tendency for an increase in the ratio of p-Ser79-ACC to total ACC was observed in CP-3(iv)-pretreated mice at 6 h post reperfusion (Fig. 3G). CP-3(iv) attenuated myocardial apoptosis as shown by reduced cytosolic cytochrome c release and diminished caspase 3 activity (Fig. 3H and I). In addition, the relative ratio of p-Ser473-Akt to total Akt was increased by 76% (Fig. 3J). No change in total CD36 expression was observed (Fig. 3K).

### **Adiponectin improves myocardial function in CP-3(iv)-treated isolated hearts**

To investigate whether myocardial adiponectin plays a direct cardioprotective role in CP-3(iv)-treated mice, we used an isolated heart model of low-flow ischemia and reperfusion in a Langendorff mode. Our results show that the rate pressure product (RPP) was largely preserved in the presence of CP-3(iv) at reperfusion, whereas delivery of rabbit anti-adiponectin mouse antibody abrogated CP-3(iv)-elicited cardioprotection (Fig. 4A). Total adiponectin tended to accumulate in the heart as assessed by ELISA (Fig. 4B); however, the amount of adiponectin secreted in the perfusate in the first minute of reperfusion was lower in CP-3(iv)-treated mice (Fig. 4C). The release of adiponectin from the isolated perfused heart decreased over time, with no significant difference observed between vehicle- and CP-3(iv)-treated mice at 7 minutes of infusion.

Consistent with these observations, myocardial hemodynamics were improved in CP-3(iv) perfused hearts compared to vehicle-treated mice in CD36<sup>+/+</sup> but not CD36<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4D-J). No change in heart rate was observed (Fig. 4K). CP-3(iv) did not modulate LDH release in the perfusate, showing values of  $8.6 \pm 1.4$  and  $6.1 \pm 0.7$  mU/min in vehicle- and CP-3(iv)-treated CD36<sup>+/+</sup> mice at baseline, and of  $7.1 \pm 1.5$  and  $7.6 \pm 1.2$  in vehicle- and CP-3(iv)-treated CD36<sup>+/+</sup> mice after 10 minutes of reperfusion, respectively.

## DISCUSSION

Notwithstanding advances in the management of acute MI/R, effective therapeutic strategies to reduce ischemia- and reperfusion-mediated injury are still needed to minimize mortality and long-term morbidity associated with this condition (21). Optimization of myocardial energy substrate metabolism has been proposed as a promising avenue for mitigating injury (7).

CD36, a scavenger receptor for oxidized lipoproteins and phospholipids, was shown to facilitate the uptake of long chain fatty acids in numerous cell types including cardiomyocytes and adipocytes (9). In the current study, we show that treatment with a novel and selective azapeptide derivative, as CD36 ligand, exerts protective effects against myocardial damage and dysfunction following transient LCAL in mice. A new perspective is introduced into the cardioprotective mechanisms of CD36 ligands, involving a potential role for adiponectin.

CD36 immunochemical inhibition was shown to reduce lipid accumulation and lipid-induced dysfunction in rat primary cardiomyocytes, pointing to a potentially deleterious role of CD36 in conditions associated with myocardial lipid overload (22). In humans with CD36 mutations, there is reduced myocardial NEFA uptake (23). Previously, we investigated the effect of the GHRP-6 derivative, EP 80317, on myocardial NEFA uptake in mice subjected to MI/R (12). Although treatment did not change myocardial fractional extraction of NEFA, total NEFA uptake was reduced, as a consequence of reduced adipose tissue lipolysis and mobilization of NEFA (12). Hence, reduced myocardial lipid burden was associated with an attenuation of LV injury and dysfunction. These observations, and the fact that first-generation CD36 ligands presented limited selectivity towards CD36, led us to develop a novel class of GHRP-6

analogs by introducing into the peptide sequence an aza-amino acid residue which conferred markedly increased potency and selectivity towards CD36, as opposed to GHSR-1a (14). Structure-activity relationship studies showed that the aza-residue brought about conformational restrictions in the peptide and a turn conformation, which may be responsible for greater metabolic stability and selectivity (14, 24). In agreement, myocardial damage and plasma cTnI were reduced by ~50% in CP-3(iv)-pretreated mice compared with vehicle-pretreated mice at 48 h after reperfusion. Moreover, a single dose of the azapeptide prior to reperfusion exerted dose-dependent reduction in MI/R injury, suggesting that protection in an acute setting may be achievable. These effects were shown to be dependent on CD36, because the treatment did not rescue MI/R-induced injury in CD36-deficient mice (Fig. 1).

Along with reduced myocardial damage, mice pretreated with CP-3(iv) displayed improved myocardial performance at 48 h post reperfusion, as determined by real-time volume conductance and pressure recordings analysis. An advantage of the the PV loop catheter technology is that it enables assessment of both load-dependent and -independent indices of systolic and diastolic *function* (25). No effect of CP-3(iv) was observed in sham-operated mice (Table 2); however, hemodynamic function deteriorated after MI/R, and was largely rescued in CP-3(iv)-treated mice. No significant change in heart rate was observed. Systolic indices of LV performance, SW and load-independent contractility PRSW, were all also improved by the azapeptide, consistent with reduced myocardial dysfunction in CP-3(iv)-pretreated mice subjected to MI/R.

Considering that CD36 ligands are potent activators of PPAR- $\gamma$  in both macrophages (26, 27) and adipocytes (28), and that their cardioprotective effect is largely associated with reduced NEFA mobilization following MI/R (12), we sought to investigate whether adiponectin, which is actively regulated by PPAR- $\gamma$  (29), might play an intermediate role in azapeptide-mediated cardioprotection. Adiponectin was shown to elicit cardioprotective effects against MI/R and other cardiac-related pathologies leading to heart failure [reviewed in (18)]. In addition, adiponectin-deficient mice showed enhanced myocardial injury in experimental MI/R (30), while adiponectin was shown to inhibit adipocyte stimulated lipolysis in murine cells (16). Our results show that plasma HMW adiponectin oligomers, the most bioactive form of

adiponectin (31), and to a lesser degree total adiponectin levels, were transiently elevated at 6 h post reperfusion in CD36<sup>+/+</sup> mice as opposed to CD36<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2). In agreement with our data, plasma adiponectin levels were also reported to be lower in CD36<sup>-/-</sup> mice as a consequence of reduced PPAR- $\gamma$  expression and activity (Fig. 2) (15).

Consistent with our previous observations with the GHRP analog EP 80317, CP-3(iv) reduced the levels of circulating NEFA (12). Thus, azapeptides may plausibly exert their cardiac protective role *in vivo* at least in part through the modulation of adipose tissue metabolic function. Adiponectin has previously been shown to enhance lipid storage capacity and to decrease lipolysis (32). The role of adiponectin had not, however, been studied in the mediation of the inhibition of lipolysis that was previously observed on treatment with CD36 ligands. Our results in epididymal fat depots showed that after 6 h of reperfusion in CP-3(iv)-pretreated mice, *Adipoq* mRNA levels were increased along with *Pparg*, its main upstream transcriptional activator (29). Furthermore, additional adiponectin upstream regulators, *Cebpb* (33) and *Sirt1* (34), as well as mRNA levels of *Nrf2*, an upstream regulator of *Pparg* and *Cebpb* (35), were elevated in CP-3(iv)-treated mice (Fig. 2). In addition, treatment with CP-3(iv) was associated with an increase in adipose mRNA levels of PPAR- $\gamma$  target genes, including *Fatp1*, *Pck1* and to a lesser degree *Cd36*, as previously reported for the first generation CD36 ligands in adipocytes (12, 28), hepatocytes (36) and macrophages (26, 27, 37). None of these genes were modulated in CP-3(iv)-treated CD36<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2). Notably, FATP1, which is downstream of adiponectin, has been reported to play an important role in attenuating adipose tissue inflammation and inducing metabolic reprogramming of adipose tissue macrophages towards an alternatively activated phenotype (38). Although these results are aligned with an increase in adiponectin biosynthesis in epididymal fat depots, the mechanisms leading to adiponectin secretion remain to be investigated. For example, indirect effects of azapeptides, such as reduced inflammatory cytokine production, may in turn increase adiponectin secretion (39). Alternatively, adiponectin clearance and conversion to different bioactive forms could be altered. Additional studies are necessary to investigate the mechanisms involved in increased adiponectin circulating levels.

Central to MI/R pathological processes are increases in ROS generation originating from different cell types and sources, including the mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase (40). The oxidative burst that follows reperfusion of ischemic hearts is associated with further damage by oxidizing cellular components and activating proteolytic enzymes (40). Adiponectin was shown to attenuate vascular and myocardial oxidative stress by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide anion in mice subjected to 30 min of transient myocardial ischemia (30). Evidence of ROS-induced decrease in mitochondrial coupling efficiency and the presence of dysfunctional oxidative phosphorylation complexes were shown in isolated hearts from AdipoR1<sup>-/-</sup> mice (41). In light of these observations, we investigated the effect of CP-3(iv) pretreatment in reducing NADPH-stimulated ROS production in LV homogenates after 6 h of reperfusion. No change in ROS production was observed in LV homogenates from CD36<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3). In contrast, in mice treated with CP-3(iv) and subjected to MI/R, we observed a small but significant reduction of mitochondrial-derived ROS in saponin-permeabilized cardiomyocyte bundles, and preservation of *aconitase activity*, a highly ROS-sensitive mitochondrial enzyme (42).

Although a direct role of adiponectin in the regulation of myocardial mitochondrial energetics remains controversial (43), control of autophagy flux in cardiomyocytes by adiponectin may indirectly contribute to beneficial metabolic and anti-apoptotic effects (44). In the context of MI/R, adiponectin was found to exert anti-apoptotic and anti-inflammatory effects through AMPK- and COX-2–dependent mechanisms, respectively (17). The activation of the COX-2-prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) pathway, through the signaling of PGE<sub>2</sub> receptors 3 and 4 (EP<sub>3</sub> and EP<sub>4</sub>), exerts important cardioprotective actions by reducing myocardial TNF- $\alpha$  production (17), which diminishes adiponectin expression and vice-versa (45). Moreover, adiponectin-elicited activation of Akt and eNOS contributed to myocardial salvage (46). Cardiomyocyte adipoR1, by way of the APPL1-AMPK axis, was shown to increase CD36 sarcolemmal translocation and to inactivate ACC through increased phosphorylation, thus regulating FA uptake and oxidation in response to adiponectin while maintaining cardiac efficiency (47). Of note, LV homogenates of CP-3(iv)-treated mice revealed increases in COX-2 protein expression, and in AMPK, Akt and ACC phosphorylation, albeit the latter did not reach statistical significance (Fig. 3). Reduced cytosolic cytochrome c release and caspase 3 activity

were also observed in the hearts of CP-3(iv)-treated mice. Although total CD36 expression levels were not modulated by CP-3(iv), a change in its sarcolemmal level could not be excluded. Altogether, these results support a role for adiponectin in mediating the cardioprotective effect of CP-3(iv) following MI/R.

Considering that both human and murine cardiomyocytes were reported to synthesize and secrete adiponectin (48), we investigated the effect of CP-3(iv) in isolated heart preparations subjected to low-flow ischemia and reperfusion in an attempt to delineate the potential role of local production of adiponectin in the cardioprotective effect of azapeptides. Our results show a striking recovery of myocardial function, assessed as the RPP in hearts perfused with CP-3(iv) at reperfusion (Fig. 4). Supporting a role for adiponectin in CP-3(iv)-elicited functional recovery, RPP return to pre-ischemia values was completely abrogated in the presence of an anti-adiponectin neutralizing antibody; however, no inhibitory effect was observed with control IgG, nor was RPP recovery observed in CP-3(iv)-perfused hearts of CD36<sup>-/-</sup> mice. Myocardial adiponectin levels tended to be increased in CP-3(iv)-reperfused hearts, but were lower in the perfusate in the first minute following reperfusion. Adiponectin *release into the perfusate effluent decayed rapidly* in the early minutes of *reperfusion*, such that after 7 minutes the effect of CP-3(iv) in reducing adiponectin secretion from the heart was not apparent compared to vehicle, and returned to the same levels as those observed during pre-ischemia. Overall, myocardial functional parameters were improved in CP-3(iv)-treated hearts, reaching statistical significance for RPP, left ventricular developed pressure and coronary flow, in a CD36-dependent manner. Furthermore, exogenous adiponectin administration increased coronary flow in rat hearts subjected to global ischemia and reperfusion (46). A limitation of the current study is the unresolved identity of the cellular source of myocardial adiponectin.

In the present study, we investigated the potential role of adiponectin, a cardioprotective adipokine and plasma biomarker of IHD (49), in the cardiovascular protection afforded by CP-3(iv). Our results support an important role for adiponectin, mainly in its HMW form, in attenuating MI/R injury and improving myocardial function in response to CP-3(iv). The effect of CD36 ligands in regulating adiponectin biosynthesis in adipose tissue was revealed

and correlated with PPAR- $\gamma$  as a main transcriptional regulator of adiponectin. Treatment with azapeptide protected against MI/R damage and its effects appear to depend, in part, on improved myocardial metabolism via reduced NEFA levels, yet a causal relationship remains to be demonstrated. The observation that an anti-adiponectin antibody abrogated the functional recovery of isolated hearts infused with the azapeptide further support a role for myocardial adiponectin in the cardioprotective effect of CP-3(iv).

Altogether, our studies have revealed a CD36-dependent adiponectin pathway in mediating the cardioprotective effect of the azapeptide prototype CP-3(iv) against MI/R, encompassing the potential for paracrine, autocrine and endocrine action of the hormone. Although further studies will be necessary to explore the detailed signaling pathways involved, our results provide evidence for increased adiponectin expression in adipose tissue, increased adiponectin circulating levels, and reduced NEFA mobilization in CP-3(iv)-pretreated mice. Furthermore, isolated heart studies pointed to a role for locally produced adiponectin in mediating CP-3(iv)-induced recovery of myocardial function following transient low-flow ischemia. Although the relative contribution of peripheral and local adiponectin in mediating the cardioprotection afforded by CD36 ligands remains to be determined, these results demonstrate the relevance of the development of selective azapeptide CD36 ligands **for** the treatment of MI/R-induced injury.

### **Author Contributions**

S. Marleau, H. Ong, and A. C. Carpentier designed the research; Y. Burelle designed experiments related to mitochondrial function and isolated heart perfusion; D. N. Huynh, V. L. Bessi, and L. Ménard performed research and manuscript preparation; J. Piquereau contributed to experiments on mitochondrial function; V. L. Bessi validated the experimental model; W. D. Lubell, C. Proulx, M. Febbraio, and Y. Burelle contributed new reagents or analytic tools; S. Marleau, D. N. Huynh, V. L. Bessi, and L. Ménard analyzed data; Y. Burelle analyzed data related to mitochondrial function; S. Marleau wrote the paper; and all authors have read, edited, and approved the final version of the manuscript.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Institute of Health Research [CIHR - MOP 97915]. V.L.B. and D.N.H. are recipients of the Fonds de recherche du Québec – Santé and Groupe de recherche universitaire sur le médicament studentships. A.C.C. is the recipient of the GSK Chair in Diabetes of the Université de Sherbrooke. The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., and Rayner, M. (2014) Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J* **35**, 2950-9
2. Lauer, M.S. (2012) Advancing cardiovascular research. *Chest* **141**, 500-5
3. Depre, C., Taegtmeyer, H. (2000) Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart. *Cardiovasc Res* **45**, 538-48
4. Verma, S., Fedak, P.W., Weisel, R.D., Butany, J., Rao, V., Maitland, A., Li, R.K., Dhillon, B., and Yau, T.M. (2002) Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* **105**, 2332-6
5. Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S., and Stanley, W.C. (2010) Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* **90**, 207-58
6. Ramasamy, R., Hwang, Y.C., Whang, J., and Bergmann, S.R. (2001) Protection of ischemic hearts by high glucose is mediated, in part, by GLUT-4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H290-H297
7. Horowitz, J.D., Chirkov, Y.Y., Kennedy, J.A., and Sverdlov, A.L. (2010) Modulation of myocardial metabolism: an emerging therapeutic principle. *Curr Opin Cardiol* **25**, 329-34
8. Lopaschuk, G.D. (2004) Targets for modulation of fatty acid oxidation in the heart. *Curr Opin Investig Drugs* **5**, 290-4
9. Silverstein, R.L., Febbraio, M. (2009) CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* **2**, re3

10. Glatz, J.F., Angin, Y., Steinbusch, L.K., Schwenk, R.W., and Luiken, J.J. (2013) CD36 as a target to prevent cardiac lipotoxicity and insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **88**, 71-7
11. Nagendran, J., Pulinilkunil, T., Kienesberger, P.C., Sung, M.M., Fung, D., Febbraio, M., and Dyck, J.R. (2013) Cardiomyocyte-specific ablation of CD36 improves post-ischemic functional recovery. *J Mol Cell Cardiol* **63**, 180-8
12. Bessi, V.L., Labbe, S.M., Huynh, D.N., Menard, L., Jossart, C., Febbraio, M., Guerin, B., Bentourkia, M., Lecomte, R., Carpentier, A.C., Ong, H., and Marleau, S. (2012) EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice. *Cardiovasc Res* **96**, 99-108
13. Vroegrijk, I.O., van Klinken, J.B., van Diepen, J.A., van den Berg, S.A., Febbraio, M., Steinbusch, L.K., Glatz, J.F., Havekes, L.M., Voshol, P.J., Rensen, P.C., van Dijk, K.W., and van Harmelen, V. (2013) CD36 is important for adipocyte recruitment and affects lipolysis. *Obesity (Silver Spring)* **21**, 2037-45
14. Proulx, C., Picard, E., Boeglin, D., Pohankova, P., Chemtob, S., Ong, H., and Lubell, W.D. (2012) Azapeptide analogues of the growth hormone-releasing Peptide 6 as cluster of differentiation 36 receptor ligands with reduced affinity for the growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* **55**, 6502-11
15. Hajri, T., Hall, A.M., Jensen, D.R., Pietka, T.A., Drover, V.A., Tao, H., Eckel, R., and Abumrad, N.A. (2007) CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes* **56**, 1872-80
16. Qiao, L., Kinney, B., Schaack, J., and Shao, J. (2011) Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes. *Diabetes* **60**, 1519-27

17. Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D.R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., and Walsh, K. (2005) Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* **11**, 1096-103
18. Nanayakkara, G., Kariharan, T., Wang, L., Zhong, J., and Amin, R. (2012) The cardio-protective signaling and mechanisms of adiponectin. *Am J Cardiovasc Dis* **2**, 253-66
19. Ascah, A., Khairallah, M., Daussin, F., Bourcier-Lucas, C., Godin, R., Allen, B.G., Petrof, B.J., Des, R.C., and Burrelle, Y. (2011) Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H144-H153
20. Nulton-Persson, A.C., Szweda, L.I. (2001) Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* **276**, 23357-61
21. Ibanez, B., Heusch, G., Ovize, M., and Van de Werf, F. (2015) Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* **65**, 1454-71
22. Angin, Y., Steinbusch, L.K., Simons, P.J., Greulich, S., Hoebbers, N.T., Douma, K., van Zandvoort, M.A., Coumans, W.A., Wijnen, W., Diamant, M., Ouwens, D.M., Glatz, J.F., and Luiken, J.J. (2012) CD36 inhibition prevents lipid accumulation and contractile dysfunction in rat cardiomyocytes. *Biochem J* **448**, 43-53
23. Kintaka, T., Tanaka, T., Imai, M., Adachi, I., Narabayashi, I., and Kitaura, Y. (2002) CD36 genotype and long-chain fatty acid uptake in the heart. *Circ J* **66**, 819-25
24. Sabatino, D., Proulx, C., Pohankova, P., Ong, H., and Lubell, W.D. (2011) Structure-activity relationships of GHRP-6 azapeptide ligands of the CD36 scavenger receptor by solid-phase submonomer azapeptide synthesis. *J Am Chem Soc* **133**, 12493-506

25. Abraham, D., Mao, L. (2015) Cardiac Pressure-Volume Loop Analysis Using Conductance Catheters in Mice. *J Vis Exp*
26. Bujold, K., Rhains, D., Jossart, C., Febbraio, M., Marleau, S., and Ong, H. (2009) CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc Res* **83**, 457-64
27. Marleau, S., Harb, D., Bujold, K., Avallone, R., Iken, K., Wang, Y., Demers, A., Sirois, M.G., Febbraio, M., Silverstein, R.L., Tremblay, A., and Ong, H. (2005) EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J* **19**, 1869-71
28. Rodrigue-Way, A., Demers, A., Ong, H., and Tremblay, A. (2007) A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology* **148**, 1009-18
29. Iwaki, M., Matsuda, M., Maeda, N., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Makishima, M., and Shimomura, I. (2003) Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **52**, 1655-63
30. Tao, L., Gao, E., Jiao, X., Yuan, Y., Li, S., Christopher, T.A., Lopez, B.L., Koch, W., Chan, L., Goldstein, B.J., and Ma, X.L. (2007) Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* **115**, 1408-16
31. Shetty, S., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2009) Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 234-9

32. Tao, C., Sifuentes, A., and Holland, W.L. (2014) Regulation of glucose and lipid homeostasis by adiponectin: effects on hepatocytes, pancreatic beta cells and adipocytes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **28**, 43-58
33. Park, B.H., Qiang, L., and Farmer, S.R. (2004) Phosphorylation of C/EBPbeta at a consensus extracellular signal-regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes. *Mol Cell Biol* **24**, 8671-80
34. Qiao, L., Shao, J. (2006) SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem* **281**, 39915-24
35. Xue, P., Hou, Y., Chen, Y., Yang, B., Fu, J., Zheng, H., Yarborough, K., Woods, C.G., Liu, D., Yamamoto, M., Zhang, Q., Andersen, M.E., and Pi, J. (2013) Adipose deficiency of Nrf2 in ob/ob mice results in severe metabolic syndrome. *Diabetes* **62**, 845-54
36. Rodrigue-Way, A., Caron, V., Bilodeau, S., Keil, S., Hassan, M., Levy, E., Mitchell, G.A., and Tremblay, A. (2014) Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPARgamma/PGC-1alpha pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes. *FASEB J* **28**, 1910-23
37. Avallone, R., Demers, A., Rodrigue-Way, A., Bujold, K., Harb, D., Anghel, S., Wahli, W., Marleau, S., Ong, H., and Tremblay, A. (2006) A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor upregulates ABC sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a PPARg-dependent pathway. *Mol Endocrinol* **20**, 3165-78
38. Johnson, A.R., Qin, Y., Cozzo, A.J., Freerman, A.J., Huang, M.J., Zhao, L., Sampey, B.P., Milner, J.J., Beck, M.A., Damania, B., Rashid, N., Galanko, J.A., Lee, D.P., Edin, M.L., Zeldin, D.C., Fueger, P.T., Dietz, B., Stahl, A., Wu, Y., Mohlke, K.L., and

- Makowski, L. (2016) Metabolic reprogramming through fatty acid transport protein 1 (FATP1) regulates macrophage inflammatory potential and adipose inflammation. *Mol Metab* **5**, 506-26
39. Simons, P.J., van den Pangaart, P.S., Aerts, J.M., and Boon, L. (2007) Pro-inflammatory delipidizing cytokines reduce adiponectin secretion from human adipocytes without affecting adiponectin oligomerization. *J Endocrinol* **192**, 289-99
40. Raedschelders, K., Ansley, D.M., and Chen, D.D. (2012) The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther* **133**, 230-55
41. Koentges, C., Konig, A., Pfeil, K., Holscher, M.E., Schnick, T., Wende, A.R., Schrepper, A., Cimolai, M.C., Kersting, S., Hoffmann, M.M., Asal, J., Osterholt, M., Odening, K.E., Doenst, T., Hein, L., Abel, E.D., Bode, C., and Bugger, H. (2015) Myocardial mitochondrial dysfunction in mice lacking adiponectin receptor 1. *Basic Res Cardiol* **110**, 37
42. Tretter, L., Ambrus, A. (2014) Measurement of ROS homeostasis in isolated mitochondria. *Methods Enzymol* **547**, 199-223
43. Braun, M., Hettlinger, N., Koentges, C., Pfeil, K., Cimolai, M.C., Hoffmann, M.M., Osterholt, M., Doenst, T., Bode, C., and Bugger, H. (2015) Myocardial mitochondrial and contractile function are preserved in mice lacking adiponectin. *PLoS One* **10**, e0119416
44. Xu, A., Sweeney, G. (2015) Emerging role of autophagy in mediating widespread actions of ADIPOQ/adiponectin. *Autophagy* **11**, 723-4

45. Zhang, H., Park, Y., and Zhang, C. (2010) Coronary and aortic endothelial function affected by feedback between adiponectin and tumor necrosis factor alpha in type 2 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2156-63
46. Gonon, A.T., Widegren, U., Bulhak, A., Salehzadeh, F., Persson, J., Sjoquist, P.O., and Pernow, J. (2008) Adiponectin protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury via AMP-activated protein kinase, Akt, and nitric oxide. *Cardiovasc Res* **78**, 116-22
47. Fang, X., Palanivel, R., Cresser, J., Schram, K., Ganguly, R., Thong, F.S., Tuinei, J., Xu, A., Abel, E.D., and Sweeney, G. (2010) An APPL1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectin in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E721-E729
48. Pineiro, R., Iglesias, M.J., Gallego, R., Raghay, K., Eiras, S., Rubio, J., Dieguez, C., Gualillo, O., Gonzalez-Juanatey, J.R., and Lago, F. (2005) Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* **579**, 5163-9
49. Hui, X., Lam, K.S., Vanhoutte, P.M., and Xu, A. (2012) Adiponectin and cardiovascular health: an update. *Br J Pharmacol* **165**, 574-90

## Legends to figures

**Figure 1.** CP-3(iv) reduces infarct area following MI/R. (A) Schematic representation of the experimental protocols. (B) Representative photomicrographs of midventricular LV sections of triphenyltetrazolium chloride (TTC)-stained slice from LV of CD36<sup>+/+</sup> mice showing the IA on the anterior section, (C) Bar graphs of % AAR/LV, IA/LV and IA/AAR of CD36<sup>+/+</sup> mice after 48 h of reperfusion, (D) Plasma cardiac troponin I levels in CD36<sup>+/+</sup> mice ( $n = 8-12$ ), (E) Representative photomicrographs of midventricular LV sections of TTC-stained slices from LV of CD36<sup>-/-</sup> mice, (F) Bar graphs of % AAR/LV, IA/LV and IA/AAR of CD36<sup>-/-</sup> mice 48 h after reperfusion, (G) Bar graphs of % IA/LV following MI/R in CD36<sup>+/+</sup> mice treated subcutaneously with increasing doses of CP-3(iv) injected 10 min before reperfusion (without prior daily treatments). Data were analyzed by 2-way ANOVA (C, F), unpaired *t*-test (D) and 1-way ANOVA followed by SNK test for multiple comparisons (G). A significant genotype  $\times$  treatment interaction ( $P = 0.00037$ ) was followed by individual *t*-tests comparisons between CP-3(iv) and vehicle-treated groups in each genotype. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 6-8$  mice per treatment group. \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. vehicle, # $P < 0.05$  vs. 289 nmol CP-3(iv)/kg and  $\lambda P < 0.05$  vs. 600 nmol CP-3(iv)/kg. Scale bar, 1 mm.

**Figure 2.** CP-3(iv) increases plasma adiponectin and adiponectin transcriptional regulators expression 6 h after reperfusion in mice that have been pretreated for 14 days. Panels A-B and C-D show bar graphs of plasma HMW form and total adiponectin at 6 h ( $n = 12-14$ ) and at 48 h of reperfusion ( $n = 8$ ) for CD36<sup>+/+</sup>, respectively, while panels F-G and H-I represent the same results for CD36<sup>-/-</sup> ( $n = 6-8$ ). Panels E and J show the relative mRNA levels of *Adipoq*, *Pparg*, *Cebpb*, *Sirt1*, *Pck1*, *Fatp1*, *Nrf2* and *Cd36* in epididymal fat. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 8-9$  (CD36<sup>+/+</sup>) and  $n = 5$  (CD36<sup>-/-</sup>). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. vehicle.

**Figure 3.** CP-3(iv) reduces LV oxidative stress and apoptosis in CD36<sup>+/+</sup> after 6 h of reperfusion in mice that have been pretreated for 14 days. Bar graphs of ROS levels in LV heart homogenates in (A) CD36<sup>+/+</sup> and (B) CD36<sup>-/-</sup>, (C) Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release in permeabilized LV myofibers ( $n = 13-14$ ) (D) Activity of aconitase in LV homogenates, (E) Western blot of pThr172-AMPK $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 and total AMPK  $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, (F) p-ACC and ACC, (G) COX-2 and  $\alpha$ -tubulin,

and (H) Cytochrome c release and (I) Activity of caspase 3 in crude LV cytosolic fractions, (J) Western blot of band densities of pSer473-Akt and total Akt LV homogenates, and (K) CD36 and  $\alpha$ -tubulin with bar graphs representing the relative band density ratios. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 5-8$ .  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$  vs. vehicle.

**Figure 4.** CP-3(iv) induces myocardial functional recovery following exposure of isolated hearts to 40 min of low-flow ischemia and reperfusion. (A) Rate pressure product (RPP) following infusion of  $10^{-6}$  M CP-3(iv) at reperfusion, in the presence or absence of  $0.3 \mu\text{g/mL}$  adiponectin antibody or non-specific polyclonal IgG. (B) Total adiponectin concentration in LV homogenate normalized to LV protein concentration and (C) HMW form adiponectin concentration in the Langendorff perfusate effluent. Panels D-K show bar graphs of Langendorff parameters (RPP, Left ventricular developed pressure, Diastolic pressure, Systolic pressure, dp/dt max, dp/dt min, Coronary flow and Heart rate) in CD36<sup>+/+</sup> and CD36<sup>-/-</sup>. Pre, pre-ischemia, Post, post-ischemia. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 4-7$ .  $*P < 0.05$  vs. vehicle and adiponectin antibody supplemented groups as assessed by two-way ANOVA for repeated-measures using the Bonferonni post-hoc test,  $**P < 0.01$  vs. pre-ischemia vehicle and CP-3(iv) treated mice and  $^{\#}P < 0.05$  vs. 1 min post-ischemia vehicle-treated mice as assessed by log-transformed one-way anova followed by SNK post-hoc test.

Table 1. Primers used for qPCR

Gene	Type	Sequence
Adipoq	Forward	5'-TGTTCTCTTAATCCTGCCCA-3'
	Reverse	5'- CCAACCTGCACAAGTTCCCTT -3'
Cd36	Forward	5'-GGCCTTACTTGGGATTGG-3'
	Reverse	5'-CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA-3'
Cebpb	Forward	5'-AAGAGCCGCGACAAGGCCAA-3'
	Reverse	5'-GCGACAGCTGCTCCACCTTCTT-3'
Fatp1	Forward	5'- TATGGGGTGGCTGTGCCAGGAG -3'
	Reverse	5'- CGCAGGAAGATGGGCCGAGCATAG -3'
Nrf2	Forward	5'-ACCATGAGTCGCTTGCCCTGGAT-3'
	Reverse	5'-TGCCAAACTTGCTCCATGTCCTGC-3'
Pck1	Forward	5'-CCAGCCAGTGCCCCATTATTGAC-3'
	Reverse	5'-TTTGCCGAAGTTGTAGCCGAAGAA-3'
Pparg	Forward	5'-GCTGAACGTGAAGCCCATC-3'
	Reverse	5'-ACGTGCTCTGTGACGATCTG-3'
Sirt1	Forward	5'-CTTGGAGCAGGTTGCAGGAATCCA-3'
	Reverse	5'-AGGGCACCGAGGAACCTACCTGATT-3'
Gapdh	Forward	5'-CGGGGTCCCAGCTTAGGTTTCATCAG-3'
	Reverse	5'-CCGTTACACCGACCTTCACCA-3'

Adiponectin (Adipoq), Cluster differentiation 36 (Cd36), CCAAT/enhancer binding protein beta (Cebpb), fatty acid transport protein 1 (Fatp1), nuclear factor (erythroid-derived 2) (Nrf2), cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase encoding gene 1 (Pck1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg), sirtuin 1 (Sirt1), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh).

Table 2. Hemodynamic measurement of left ventricular function in sham- and MI/R-operated mice at 48 h after ischemia

Treatment	Sham-operated		MI/R	
	0.9% NaCl	CP-3(iv)	0.9% NaCl	CP-3(iv)
BW, g	28 ± 1	27 ± 1	28 ± 1	28 ± 1
Tibial length, mm	18 ± 0.1	18 ± 0.1	18 ± 0.2	18 ± 0.2
HR, min <sup>-1</sup>	439 ± 11	422 ± 14	448 ± 16	470 ± 20
SV, μL	17 ± 1	16 ± 1	11 ± 1 <sup>***,###</sup>	15 ± 1 <sup>††</sup>
CO, mL/min	7.4 ± 0.3	6.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2 <sup>***,##</sup>	7.0 ± 0.7 <sup>††</sup>
Ea, mmHg/μL	5.5 ± 0.3	6.0 ± 0.5	7.2 ± 0.6	5.7 ± 0.4
SVR, mmHg min/mL	13 ± 1	15 ± 1	18 ± 1 <sup>**,#</sup>	14 ± 1 <sup>†</sup>
<b>Systolic indices</b>				
EF, %	73 ± 4	83 ± 2	66 ± 6 <sup>#</sup>	78 ± 5
Pes, mmHg	95 ± 4	101 ± 4	88 ± 8	94 ± 6
Ves, μL	6.9 ± 1	3.5 ± 1	6.5 ± 2	5.2 ± 2
dP/dt max, mmHg/s	7757 ± 287	8410 ± 664	6358 ± 731	7031 ± 518
SW, mmHg μL	1356 ± 104	1329 ± 62	707 ± 92 <sup>***,###</sup>	1055 ± 140 <sup>†</sup>
PRSW, mmHg	83 ± 6	86 ± 9	64 ± 3 <sup>*,#</sup>	92 ± 5 <sup>†</sup>
<b>Diastolic indices</b>				
Ped, mmHg	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.4	7.3 ± 0.8 <sup>***,##</sup>	6.9 ± 1.4 <sup>***,##</sup>
Ved, μL	24 ± 2	20 ± 1	17 ± 2	20 ± 3
dP/dt min, mmHg/s	-6807 ± 457	-7002 ± 381	-5783 ± 788	-6658 ± 642
tau, ms	9.8 ± 0.7	10.2 ± 0.4	10.7 ± 0.8	9.3 ± 0.6

*Mice* were randomized to *one* of four study groups ( $n = 7$  per group). One mouse was excluded because of severe bleeding during surgery (CP-3(iv), MI/R). Hemodynamic measurements were performed at 48 h after myocardial ischemia caused by a 30 min coronary artery ligation in mice. BW, body weight; HR, heart rate; SV, stroke volume; CO, cardiac output; Ea, arterial elastance; SVR, systemic vascular resistance; EF, ejection fraction; Pes, end systolic pressure; Ves, end systolic volume;  $dP/dt_{max}$  (or min), maximal rate of pressure increase (or decline); SW, stroke work; PRSW, preload recruitable stroke work; Ped, end diastolic pressure; Ved, end diastolic volume; tau, time constant of relaxation (varying asymptote method). Data are mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA was applied for comparisons with the Student Newman Keuls post-test.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  vs. vehicle-treated sham mice;  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$  and  $^{\#\#\#}P < 0.001$  vs. CP-3(iv)-treated sham mice;  $^{\dagger}P < 0.05$  and  $^{\dagger\dagger}P < 0.01$  vs. vehicle-treated MI/R mice.

Figure 1.

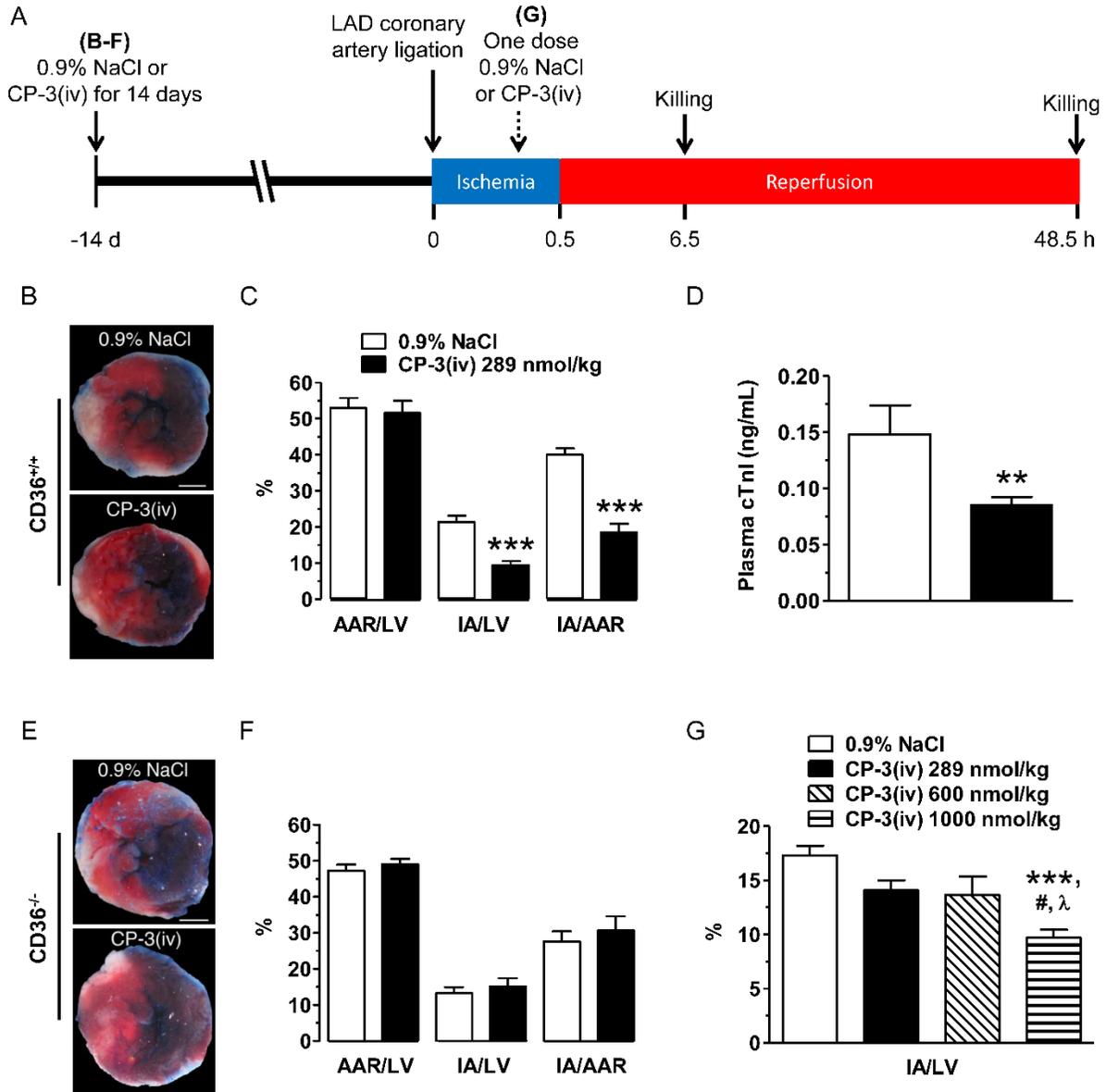


Figure 2.

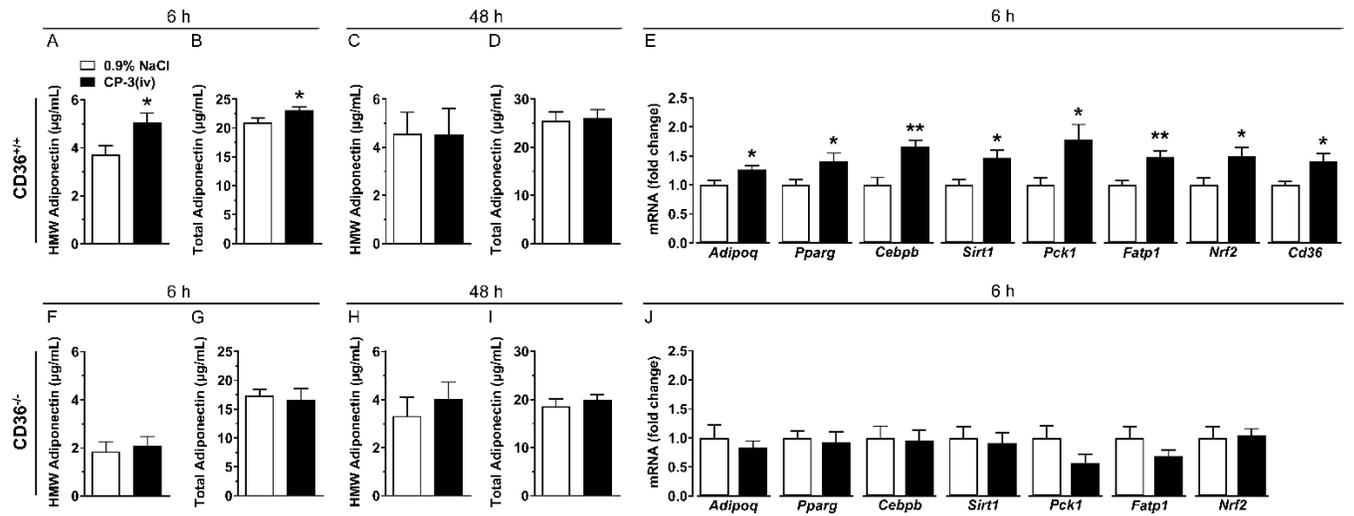


Figure 3.

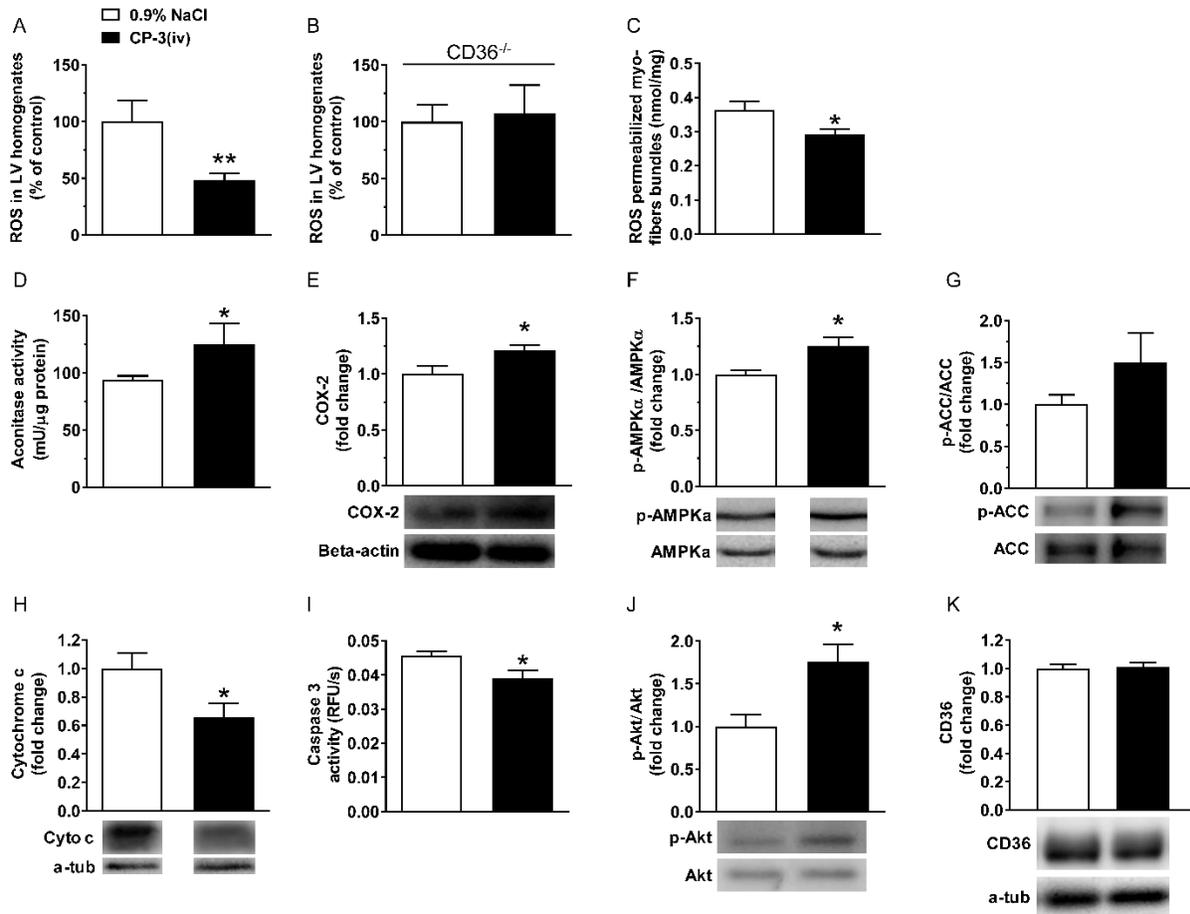
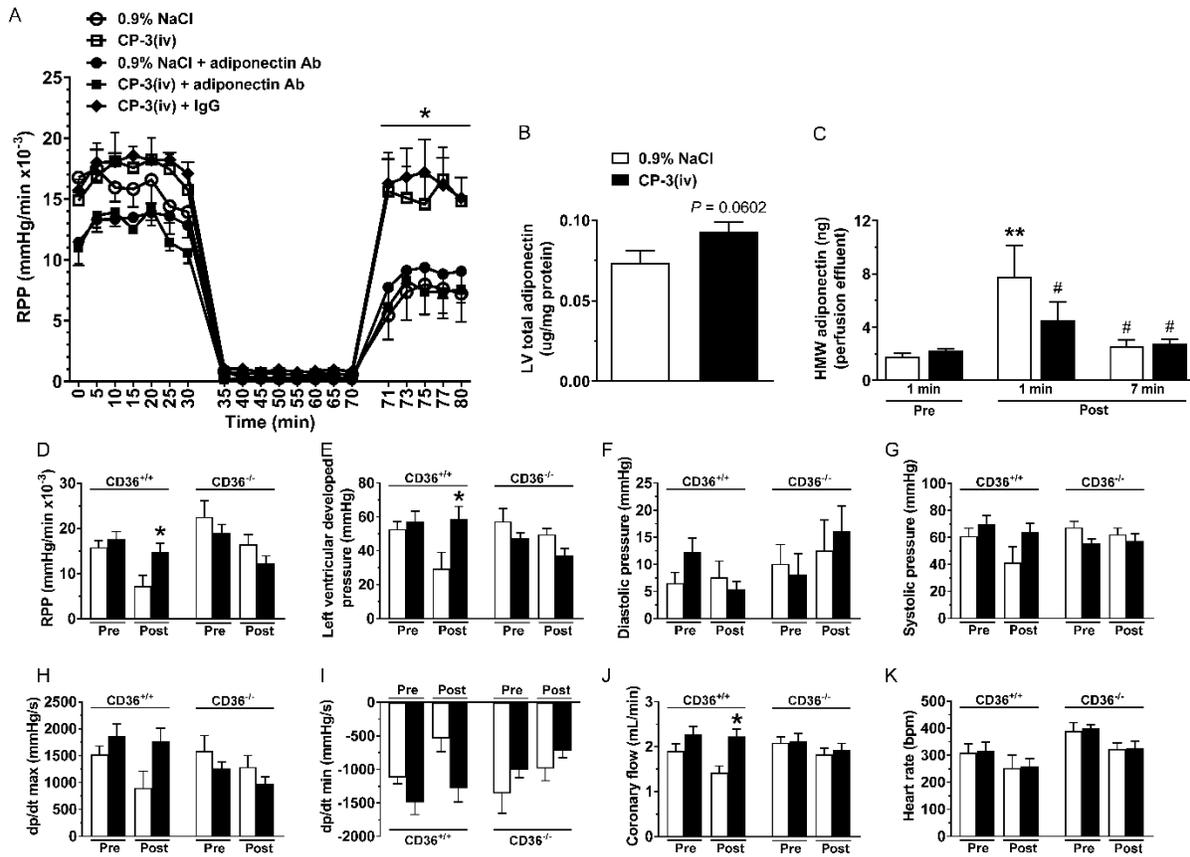


Figure 4.



### **3.2 Deuxième étude: A linear fragment of unacylated ghrelin (UAG<sub>6-13</sub>) protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in mice in a growth hormone secretagogue receptor-independent manner**

Article publié dans *Front Endocrinol.* 11;9:798 (2019)

David N. Huynh<sup>1</sup>, Hanan Elimam<sup>1,2</sup>, Valérie L. Bessi<sup>1</sup>, Liliane Ménard<sup>1</sup>, Yan Burelle<sup>3</sup>, Riccarda Granata<sup>4</sup>, André C. Carpentier<sup>5</sup>, Huy Ong<sup>1\*</sup>, and Sylvie Marleau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup>Faculty of Pharmacy, University of Sadat City, Sadat City, Egypt

<sup>3</sup>Faculty of Health Sciences, University of Ottawa, Ontario, Canada

<sup>4</sup>Department of Medical Science, University of Turin, Turin, Italy

<sup>5</sup>Department of Medicine, Division of Endocrinology, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

\*Correspondence:

Dr Sylvie Marleau

[sylvie.marleau@umontreal.ca](mailto:sylvie.marleau@umontreal.ca)

Dr Huy Ong

[huy.ong@umontreal.ca](mailto:huy.ong@umontreal.ca)

## **Contribution des auteurs**

### **David N. Huynh**

Partie expérimentale (figure 1, 2, 3 et 4; tableau 1), analyse des résultats et analyses statistique, conceptualisation du projet, participation à l'écriture du manuscrit

### **Hanan Elimam**

Analyse des résultats (figure 1), participation à l'écriture du manuscrit

### **Valérie L. Bessi**

Partie expérimentale du projet pilote

### **Liliane Ménard**

Partie expérimentale (figure 1, 2, 3 et 4; tableau 1)

### **Yan Burelle**

Implication dans la conceptualisation du projet pour la partie *ex vivo*

### **Riccarda Granata**

Révision critique du manuscrit

### **André C. Carpentier**

Implication dans la conceptualisation du projet et révision critique du manuscrit

### **Huy Ong**

Conceptualisation du projet et révision critique du manuscrit

### **Sylvie Marleau**

Conceptualisation du projet, analyse des résultats et écriture du manuscrit

## Résumé

La ghréline désacylée (UAG), la forme prédominante de la ghréline en circulation, a été montrée comme exerçant des effets cardioprotecteurs dans des cardiopathies expérimentales. Cette étude a pour but d'investiguer les effets cardioprotecteurs d'un fragment linéaire bioactif de l'UAG contre les dommages et la dysfonction induits par une ischémie du myocarde chez les souris C57BL/6 et les mécanismes impliqués. Les traitements ont été administrés à des doses de 100 (UAG), 1000 et 3000 (UAG<sub>6-13</sub>) nmol/kg à 12 h d'intervalle pendant les 14 jours précédant une ligature de l'artère coronaire descendante gauche pendant 30 min et d'une reperfusion pour une période de 6 ou 48 h. La taille de l'infarctus a été réduite de manière dépendante de la dose à 48 h de reperfusion, avec une réduction de 54% à la dose la plus élevée testée de l'UAG<sub>6-13</sub>. L'hémodynamique du myocarde a été améliorée, telle que démontré par une augmentation du débit cardiaque, le dérivé de pression par rapport au temps maximal (dP/dt<sub>max</sub>) et de la relation entre le travail systolique et le volume télédiastolique (PRSW), un index de contractilité indépendant de la charge. Six heures après la reperfusion, les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  ont été réduits, et l'effet a été maintenu à 48 h pour le TNF- $\alpha$ . La protéine kinase activée par l'AMP 5' (AMPK) a été activée, alors que l'activité de l'acétyl-CoA carboxylate (ACC) a été inhibée, et les concentrations des protéines apoptotiques ont été diminuées. Dans les cœurs isolés, l'effet de l'UAG<sub>6-13</sub> n'a pas été affecté par la présence de D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, un antagoniste du récepteur de la ghréline (GHS-R1a), suggérant que le peptide agit par une voie indépendante du GHS-R1a. Les résultats supportent une application thérapeutique des fragments bioactifs de l'UAG contre les dommages de l'ischémie/reperfusion du myocarde.

Mots-clés: ischémie/reperfusion cardiaque, analogues de la ghréline désacylée, hémodynamique, récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance, facteur- $\alpha$  de nécrose tumorale, interleukine-6, cœur isolé.

## Abstract

Unacylated ghrelin (UAG), the most abundant form of ghrelin in circulation, has been shown to exert cardioprotective effect in experimental cardiopathies. The present study aimed to investigate the cardioprotective effect of a linear bioactive fragment of UAG against myocardial ischemia-induced injury and dysfunction in C57BL/6 wild type mice and the mechanisms involved. Treatments were administered at doses of 100 (UAG), 1000 and 3000 (UAG<sub>6-13</sub>) nmol/kg at 12 h interval during 14 days prior to 30 min left coronary artery ligation and reperfusion for a period of 6 or 48 h. The infarct area was decreased in a dose-dependent manner at 48 h of reperfusion, with a reduction of 54% at the highest dose of UAG<sub>6-13</sub> tested. Myocardial hemodynamics were improved, as demonstrated by an increase in cardiac output, maximum first derivative of left ventricular pressure, and preload recruitable stroke work, a load-independent contractility index. Six hours after reperfusion, circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  pro-inflammatory cytokines were reduced, and the effect was maintained at 48 h for TNF- $\alpha$ . 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) was activated, while acetyl-CoA carboxylase (ACC) activity was inhibited, along with a decrease in apoptotic protein levels. In isolated hearts, the effect of UAG<sub>6-13</sub> was unaffected by the presence of D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, a ghrelin receptor (GHSR1a) antagonist, suggesting that the peptide acted through a GHSR1a-independent pathway. The results support the therapeutic application of UAG bioactive peptide fragments against myocardial ischemia/reperfusion injury.

Keywords: cardiac ischemia/reperfusion, unacylated ghrelin analogs, hemodynamics, growth hormone secretagogue receptor, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, isolated heart.

## Introduction

Ghrelin, an endogenous selective ligand of growth hormone secretagogue receptor (GHSR), was discovered by Kojima et al. in 1999 as the first known circulating octanoylated peptide (Kojima et al., 1999). The predominant circulating form of ghrelin in circulation is unacylated in position 3 (unacylated ghrelin - UAG) (Kojima et al., 2005). In contrast to acylated ghrelin (AG), UAG is devoid of growth hormone (GH)-releasing activity, orexigenic, adipogenic and diabetogenic activities; however it shares cardioprotective effects mediated through a still elusive receptor independent of GHSR1a (Veldhuis and Bowers, 2010). Although the mechanism through which UAG exerts cardioprotection has not been fully elucidated, activation of pro-survival pathways, in addition to anti-inflammatory and antifibrotic activities (reviewed in Angelino et al., 2015), supports its therapeutic potential in myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury. Indeed, MI/R is associated with intense inflammation, apoptosis and ensuing morbidity associated with pathological remodeling (Frangogiannis et al., 2002; Prabhu and Frangogiannis, 2016).

Structure-activity relationship studies of UAG uncovered the bioactivity of shorter fragments devoid of serine in the third position (Granata et al., 2012). In particular, linear UAG<sub>6-13</sub> (Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-NH<sub>2</sub>) and its head-to-tail cyclic derivative (cUAG<sub>6-13</sub>), retain UAG bioactivity in enhancing survival of pancreatic islets and beta cells and diminishing oxidative stress and senescence of human circulating endothelial progenitor cells (Granata et al., 2012). UAG<sub>6-13</sub> blocked streptozotocin-induced diabetes in rats (Granata et al., 2012), whereas cUAG<sub>6-13</sub> (AZP-531) reduced high fat diet-associated inflammation and prediabetes in mice (Delhanty et al., 2013). Administration of AZP-531 in mice subjected to transient left coronary artery ligation (LCAL) at 5 minutes (pre-) and 30 minutes (post-) reperfusion reduced myocardial infarction through attenuating reperfusion-elicited oxidative stress and activating pro-survival pathways (Harrisseh et al., 2017).

The present study aims to investigate the cardioprotective effect of linear UAG<sub>6-13</sub> in reducing MI/R-induced injury and improving hemodynamic performance and to examine underlying mechanisms.

## Material and Methods

### Mice treatments and surgery

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals and to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (A5213-01).

Four-month-old male C57BL/6 mice, bred and maintained in-house, were used to determine the effect of UAG<sub>6-13</sub> pretreatment on myocardial infarct size and myocardial functional recovery after 30 min of ischemia and 48 h of reperfusion. UAG-treated mice were used as a positive control group with known cardioprotective effects. Additional groups of mice were used to investigate the effect of UAG/UAG<sub>6-13</sub> pretreatment on inflammatory and/or metabolic critical processes in the early (6 h) post-reperfusion stage. The isolated perfused heart model was used to determine whether myocardial GHSR1a was involved in the cardioprotective effect of UAG<sub>6-13</sub> fragment through pharmacological means, e.g. use of AG receptor antagonist (D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6).

MI/R was performed as described previously (Bessi et al., 2012; Huynh et al., 2018), as shown in Figure 1A. Briefly, C57BL/6 mice were pretreated during 14 days by twice daily subcutaneous (s.c.) injections of UAG (100 nmol/kg), UAG<sub>6-13</sub> (1 or 3 µmol/kg) or vehicle (0.9% NaCl). The last dose of these drugs was administered 30 minutes prior to ligation of the left anterior descending (LAD) coronary artery and on the following day, where applicable. Mice were injected intraperitoneally (i.p.) with buprenorphine (0.05 mg/kg) prior to endotracheal intubation and ventilated using Minivent mouse ventilator (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) during surgery under isoflurane anesthesia. Transient myocardial ischemia was induced by the insertion of an 8-0 nylon suture tied over a piece of tubing at 1 mm below the edge of atrial appendage. Lidocaine (6 mg/kg) i.p. was injected just after occlusion and 10 min prior to reperfusion to prevent fatal arrhythmias. The chest cavity was closed using a 6-0 silk suture and the animals were allowed to recover for 6 or 48 h. Mice subjected to 6 h of reperfusion were anesthetized with isoflurane and euthanized by exsanguination. Assessment of the impact of treatments on myocardial infarction area was performed following re-occlusion of

the original ligation site after 48 h of reperfusion, followed by injecting 300  $\mu$ L of KCl (1 M) in the subclavian vein and Evans blue (2%) through the aorta. Analysis was performed on triphenyltetrazolium chloride (TTC) (1%)-stained slices by computerized planimetry by an observer blinded to the treatment protocol (Bessi et al., 2012).

### **Myocardial hemodynamics as assessed by conductance catheter**

Left ventricle (LV) function parameters were derived from pressure-volume (PV) analysis using a miniaturized PV conductance catheter, as described previously (Bessi et al., 2012). Briefly, a left thoracotomy was performed at 48 h post-surgery, and a microtip 1.4 Fr PV catheter (SPR 839, Millar Instruments) was inserted through the LV apex, connected to a transducer system (Millar). PV signals were recorded at steady-state and during vena cava occlusion to reduce pre-load transiently. Absolute volume data were adjusted by inserting the catheter in a cuvette with pre-defined volume containing heparinized blood at 37°C at the end of each experiment and corrected for the parallel conductance through the hypertonic saline bolus injection method. Data were analyzed using IOX2 software (EMKA technologies, Paris, France).

### **Isolated perfused heart assay**

Hearts from anesthetized (3% isoflurane mixed with 100% oxygen) and heparinized (5,000 U/kg, i.p.) male C57BL/6 mice were isolated and immersed in ice-cold Krebs-Henseleit bicarbonate buffer containing 118 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, 8 nM insulin, 1.5 mM lactate, 0.2 mM pyruvate, and 0.5 mM EDTA, as described previously (Huynh et al., 2018). After pericardial fat removal, the aorta was cannulated with an 18-gauge cannula, and the heart was perfused retrogradely in a nonrecirculating mode at a constant perfusion pressure of 80 mmHg with Krebs-Henseleit bicarbonate buffer supplemented with 1.2 mM palmitate in 2% fatty acid-free bovine serum albumin and gassed with 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub>. Hearts were subjected to 30 min of aerobic perfusion, followed by 40 min of low-flow ischemia (10% of preischemic flow) and 10 min of reperfusion. Hearts with rate of perfusion pressure (RPP) less than 10,000 mmHg/min during baseline were excluded from the study. AG, D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 and UAG<sub>6-13</sub> were administered in a non-recirculating mode via retrograde perfusion throughout the 10 min of

reperfusion post-ischemia via a side port directly above the aortic cannula at final concentrations of 1, 10 and 30  $\mu$ M, respectively. Contractile function was monitored continuously by means of a fluid-filled balloon inserted in the LV connected to a pressure transducer. Ventricular pressures and heart rates were recorded with a PowerLab/8sp instrument and analyzed with Chart v5.0.1 software (AD Instruments, Bella Vista, NSW, Australia). Coronary effluent was collected at various time intervals for measurements of coronary flow.

### **Western blots**

LV were homogenized using a dounce homogenizer (TRI-R S63C, ON, Canada) in PBS containing a protease and phosphatase inhibitors cocktail (Thermo Scientific Pierce). Homogenates were separated into two tubes. Total homogenates were obtained by sonication for 60 min on ice with an equal volume of lysis buffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 2% Triton X-100, 0.2% SDS, pH = 7.4), centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4°C, and the supernatant was kept at -80°C. To collect the cytosolic fraction, the other tube was centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C, the supernatant was centrifuged at 9,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatant was kept at -80°C. The protein concentration was determined by the BCA assay (Pierce Biotechnology). Equal amounts (25  $\mu$ g) of protein extracts were loaded on SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad Laboratories). After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies; polyclonal rabbit anti-Akt and anti-phosphoSer473-Akt were used for the total homogenates, while polyclonal rabbit anti-acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC), anti-phosphoSer79-ACC (ACC1 and ACC2), anti-5' AMP-activated protein kinase (AMPK) $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, anti-phosphoThr172-AMPK (1:1000 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), monoclonal mouse anti-cytochrome c (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), polyclonal goat anti-AIF (Santa Cruz, Dallas, TX, USA) were used for the cytosolic fractions. Monoclonal mouse anti- $\alpha$ -tubulin (1:5000, Abcam) was used as an internal control and detected on the same membrane (Supplemental Figures 2-10). Membranes were incubated with HRP-conjugated secondary goat anti-rabbit IgG (1:10000, Jackson Immunoresearch), goat anti-mouse IgG (1:10000, KPL) or donkey anti-goat IgG (1:10000, Abcam). Bands from the same blot were detected by enhanced chemiluminescence and analyzed using ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, ON, Canada).

## **Plasma cytokines**

Blood from non-fasted mice was collected on 4 mM EDTA to determine interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) plasma levels using commercial kits (eBioscience, Waltham, MA, USA; catalog numbers 88-7064 and 88-7324, respectively) by following manufacturer's instructions.

## **Statistical analysis**

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed using unpaired one- or two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls (SNK) method for multiple *post hoc* comparisons (GraphPad Prism Version 7.02, San Diego, CA). Probability values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## **Results**

### **UAG and UAG<sub>6-13</sub> pretreatments protect from myocardial ischemia/reperfusion injury and preserve LV hemodynamics**

C57BL/6 mice were pretreated with UAG, UAG<sub>6-13</sub> or 0.9% NaCl (vehicle) at 12 h interval for 14 days and 30 minutes prior to LCAL induced by the proximal occlusion of the left anterior descending coronary artery, followed by 6 or 48 h of reperfusion (Figure 1A). Our results display a consistently large myocardial area-at-risk (AAR) (slightly more than 50% of the LV area) in all groups as shown by representative photomicrographs of TTC-stained midventricular, transverse slices (Figure 1B). The AAR/LV ratio did not differ significantly between groups (Figure 1C), suggesting that the ligation was reproducibly performed at the same LAD level. We first investigated the cardioprotective effect of UAG at a dose equimolar to that previously published for AG shown to exert a cardioprotective effect in experimental cardiopathies (Li et al., 2006; Pei et al., 2014). Our results show that prophylactic administration of UAG (100 nmol/kg twice daily), used as a positive control, significantly reduced infarct area (IA) to AAR by 43%, whereas 10-30-fold higher doses of UAG<sub>6-13</sub> reduced myocardial infarction to a similar extent (34-54%) (Figure 1D).

In parallel studies, the effect of a preventive administration of UAG and UAG<sub>6-13</sub> on systemic hemodynamics and indices of systolic and diastolic function was determined using conductance catheter-derived PV relationship at 48 h of reperfusion as carried out previously (Bessi et al., 2012; Huynh et al., 2018). Vehicle-treated mice exhibited similar LV dysfunction as those subjected to the same MI/R protocol (Bessi et al., 2012; Huynh et al., 2018). Compared to vehicle-treated mice, UAG<sub>6-13</sub> improved systemic hemodynamics by increasing stroke volume and cardiac output by 40 and 58%, respectively (Table 1). Although systolic LV indices, including ejection fraction (EF), end systolic pressure (ESP) and end systolic volume (ESV), were modestly improved by the peptides at their respective administered doses, stroke work was increased by 55% and 81% by UAG and UAG<sub>6-13</sub>, respectively. The peak rate of rise in the first derivative of left ventricular pressure ( $dP/dt_{max}$ ) was increased by ~40% by both treatments as well as that of preload recruitable stroke work (PRSW), a load-independent indice of contractility, by 49% (UAG) and 39% (UAG<sub>6-13</sub>). Reduced tau and increased  $dP/dt_{min}$  suggested improved diastolic relaxation.

### **UAG and UAG<sub>6-13</sub> pretreatments exert anti-inflammatory effects**

We investigated the potential anti-inflammatory effect of UAG and UAG<sub>6-13</sub> peptides in early (6 h) and late (48 h) reperfusion following myocardial ligation. Our results show that after 14 d pretreatment twice daily, UAG (100 nmol/kg) and UAG<sub>6-13</sub> (3000 nmol/kg) transiently reduced plasma IL-6 levels by 76 and 70% at 6 h, respectively, whereas this effect vanished by 48 h (Figures 2A, B). In a similar manner, substantial inhibitory effect of treatments was observed on plasma TNF- $\alpha$  levels at 6 h following MI/R, by 43% (UAG) and 62% (UAG<sub>6-13</sub>). The inhibitory effect was maintained at 48 h, as shown by a 78% in UAG-treated, and 46 and 80% reductions in UAG<sub>6-13</sub> (1,000 and 3,000 nmol/kg)-treated mice (Figures 2C, D).

Neither UAG nor UAG<sub>6-13</sub> pretreatment modulated body weight, food or water intake, glycemia, insulin and non-esterified fatty acid (NEFA) plasma levels (Supplemental Figure 1).

### **Phosphorylation of myocardial AMPK, ACC and apoptosis-related markers after MI/R in UAG and UAG<sub>6-13</sub>-treated mice**

Western blots analysis of LV protein homogenates showed that the mean relative ratio of pThr172-AMPK to total AMPK band density was increased by 83% after 6 h reperfusion in ischemic hearts of mice treated twice daily with UAG<sub>6-13</sub> (3,000 nmol/kg), compared with vehicle-treated mice (Figure 3A). In contrast, pSer473-Akt to total mean Akt ratio was unchanged compared to that of vehicle-treated mice at this time-point (Figure 3B). However, the mean ratio of pSer79-ACC to total ACC was increased by 91% in both UAG (100 nmol/kg) and UAG<sub>6-13</sub> (3000 nmol/kg)-twice daily treated mice (Figure 3C). Expression of mitochondrial signaling proteins of apoptosis, cytochrome c and apoptosis inducing factor (AIF), was significantly reduced in LV cytosolic fraction by UAG<sub>6-13</sub> treatment but not in UAG-treated mice (Figures 3D, E). Complete scanned gels for western blots are shown in Supplementary Figures 2-10.

### **UAG<sub>6-13</sub> improves myocardial hemodynamics in isolated hearts in a GHSR1a-independent manner**

To investigate whether UAG<sub>6-13</sub> exerts cardioprotective effect through a GHSR1a-independent pathway in the heart, we used an isolated heart model of low-flow ischemia and reperfusion in Langendorff mode to assess the rate of perfusion pressure (RPP) and additional hemodynamic parameters. Hearts from 20 mice were sorted according to the following pharmacological treatments: AG and AG + D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, as positive and negative control groups; UAG<sub>6-13</sub> and UAG<sub>6-13</sub> + D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, as tested groups. Our results show that the RPP was largely preserved in the presence of both AG and UAG<sub>6-13</sub> at reperfusion (Figure 4A). Treatment with D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 completely abolished RPP rescue by AG at reperfusion; in contrast, D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 did not have any effect on UAG<sub>6-13</sub>-elicited cardioprotection. Consistent with improved RPP in the presence of UAG<sub>6-13</sub>, myocardial hemodynamics tended to be improved by UAG<sub>6-13</sub> treatment with or without D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, although no change was observed in heart rate and coronary flow (Figures 4B-G).

### **Discussion**

The main finding of this study is that a preventive treatment with a linear UAG fragment, UAG<sub>6-13</sub>, reduced MI/R-induced injury and rescued hemodynamic dysfunction in mice, in a GHSR1a-

independent manner. The cardioprotective effects were associated with potent, time-dependent and systemic anti-inflammatory effects of the treatment. These observations are consistent with those of HARRISSEH et al. who showed that an acute administration of cyclic UAG<sub>6-13</sub> (cUAG<sub>6-13</sub> or AZP-531), in a similar dose range, reduced infarct size following MI/R in mice, as a consequence of an early activation of pro-survival and anti-oxidative pathways (HARRISSEH et al., 2017).

AG/GHSR1a axis has been proposed as a promising therapeutic target in a variety of metabolic disorders due to its pleiotropic effects on appetite, energy metabolism, glucose homeostasis and GH release. While the two circulating forms of ghrelin present distinct endocrine activities (Gasco et al., 2010), they also share many peripheral biological activities, through the binding of an as of yet elusive receptor (Chabot et al., 2014; Delhanty et al., 2014; Granata et al., 2011; Muller et al., 2015). Both forms may be beneficial to rescue myocardial dysfunction elicited by drugs such as isoproterenol or doxorubicin or ischemia in isolated hearts, cardiomyocytes and in preclinical models (Baldanzi et al., 2002; Chang et al., 2004a; Chang et al., 2004b; Lear et al., 2010; Li et al., 2006; Pei et al., 2014; Xu et al., 2010). While AG is cardioprotective, its pleiotropic effects and GH secretagogue activity may jeopardize its favorable effects in protecting the heart following long-term exposure with the potential of eliciting serious adverse events such as cancer growth and metastasis (Pradhan et al., 2013). In contrast, UAG, the most abundant circulating form of ghrelin, shows GH- and GHSR1a-independent effects in promoting anti-apoptotic pathways in cardiomyocytes and protecting against drug-induced cardiac dysfunction and fibrosis (Pei et al., 2014).

UAG fragments were studied for their bioactivity and ability to mimic UAG pro-survival effect on beta cells and human pancreatic islets (Granata et al., 2012). UAG fragment 6-13 showed cardioprotective effect (HARRISSEH et al., 2017), and full cyclization of the peptide did not affect its bioactivity and improved its pharmacokinetics (Julien et al., 2012). Cyclic UAG<sub>6-13</sub> improved mitochondrial function, reduced apoptosis and myocardial damage at 15 min and 24 h following reperfusion, respectively. In agreement, our results show reduced myocardial damage at 48 h following reperfusion and further show that these beneficial effects were associated with improved hemodynamics and reduced plasma TNF- $\alpha$  levels at this time point. In addition, the

anti-apoptotic effect observed by Harisseh et al. after 15 min of reperfusion appeared to be maintained at 6 h, a time point at which changes in myocardial metabolism is apparent (Bessi et al., 2012). Although the present work does not allow direct comparison of the cardioprotective efficacy of cyclic and linear forms of UAG<sub>6-13</sub> as experimental designs, doses and endpoints differed between studies, the present work confirms that the UAG<sub>6-13</sub> fragment is cardioprotective and furthermore, that it also improves cardiac hemodynamics and contractility, as shown by a significant increase in cardiac output, dP/dt<sub>max</sub> and PRSW.

Both oxidative stress and pro-inflammatory cytokines play a role in promoting an inflammatory response to MI/R (Ahn and Kim, 2012). In the present study, we further investigated the effect of UAG and UAG<sub>6-13</sub> on plasma levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  at 6 h of reperfusion, a time point at which myocardial levels of these cytokines are elevated in humans (Turillazzi et al., 2014). Our results show that treatment with UAG and UAG<sub>6-13</sub> elicited a striking, but transient, reduction of IL-6 plasma levels, whereas TNF- $\alpha$  levels were diminished at both 6 and 48 h after reperfusion. Of interest, UAG and UAG<sub>6-13</sub> shared a similar transient inhibitory profile for IL-6 and a prolonged effect on TNF- $\alpha$ , notwithstanding differences in doses. The reason for the prolonged effect of the treatment on TNF- $\alpha$  versus IL-6 plasma levels is not clear, but might be related to the fact that TNF- $\alpha$  clearance is four times lower than IL-6 in rats (Deaciuc et al., 1996). Elevated levels of circulating inflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$  and IL-6, have been associated with myocardial dysfunction and increased apoptosis following MI/R (Saini et al., 2005). Whereas an acute administration of cUAG<sub>6-13</sub> (5 min before reperfusion) was shown to increase myocardial anti-oxidative and anti-apoptotic pathways at 15 min after reperfusion (Harisseh et al., 2017), a pretreatment with linear UAG<sub>6-13</sub> (with the last dose administered 30 min before ligation), but not UAG, reduced cytochrome c and AIF protein expression after 6 h of reperfusion, suggesting that both caspase dependent and independent pathways have been activated (Choudhury et al., 2010). Our results differ from those of Pei et al. (2014) who showed that UAG, in a similar dose range, administered after doxorubicin injection in younger (10-12 weeks old) C57BL/6 mice, showed reduced myocardial apoptosis in treated mice. Yet, it has been reported that doxorubicin-induced cardiac injury promotes endogenous ghrelin release, which may thus contribute to the cardioprotective and anti-apoptotic mechanisms elicited by UAG in that model (Xu et al., 2007).

As reported previously for HL-1 cardiomyocytes (Lear et al., 2010), the ratio of p-AMPK/AMPK was not significantly changed in UAG-treated mice, but was increased by UAG<sub>6-13</sub> at 6 h of reperfusion, which may contribute to protect the heart through the attenuation of TNF- $\alpha$ -elicited apoptosis (Kewalramani et al., 2009) and/or modulate myocardial energy metabolism. Along these lines, p-ACC/ACC was increased by the pretreatments, leading to enhanced  $\beta$ -oxidation and ATP production (Bairwa et al., 2016). Whether myocardial glucose metabolism was increased and fat metabolism decreased by the treatments remain to be investigated.

An enigmatic issue about the receptor or receptor subtypes involved in mediating the effects of UAG and UAG fragments still remains. In the heart, a number of different receptor subtypes have been proposed, including ghrelin receptor-like receptor (GRLR) that would bind ghrelin and UAG, as well as UAG receptors and GHSR1a (Callaghan and Furness, 2014). To investigate whether UAG<sub>6-13</sub> exerted its cardioprotective effect via the ghrelin receptor GHSR1a, we perfused isolated mice hearts with the ghrelin fragment in the presence or absence of the ghrelin antagonist, D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, a selective antagonist of the AG receptor. Our results showed that while D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 inhibited AG-induced rescue of RPP, it did not interfere with the effect of UAG<sub>6-13</sub>. These observations support that the cardioprotective effect on myocardial hemodynamics afforded by UAG<sub>6-13</sub>, even at a dose of 30  $\mu$ M, is likely to be mediated by UAG receptors. In the present study, the effect of UAG<sub>6-13</sub> was investigated in pretreated mice. Although this experimental design may limit translation to acute clinical situation of MI/R, previous studies investigating the cardioprotective effect of hexarelin, a small synthetic growth hormone peptide, required a 7-14 days pretreatment in rats (De Gennaro Colonna et al., 1997). Yet, hexarelin was later shown to improve cardiac performance by increasing left ventricular ejection fraction in humans following an acute administration (Broglio et al., 2001; Broglio et al., 2002). The cardioprotective effect of a single dose of the linear octapeptide UAG fragment in mice after the onset of myocardial ischemia remains to be investigated.

In conclusion, the results of this study show that a pretreatment with a linear bioactive fragment of UAG reduced myocardial damage following MI/R and for the first time shows that these

beneficial effects are associated with improved myocardial hemodynamics, along with potent and prolonged anti-inflammatory effects over 48 h. These observations add to the early (15 min) anti-oxidative and pro-survival activation pathways seen with the cyclic peptide (Harrisseh et al., 2017). Furthermore, we show that UAG<sub>6-13</sub> exerted cardioprotective effects via mechanisms that are independent of GHSR1a. Taken together, these results support further studies to investigate the mechanisms and pharmacokinetics of the peptide for the translation of these observations.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Author Contributions**

DH, HE, VB and LM performed the experiments and/or assays and analysis. ACC, HO, SM and YB designed the study and analyzed the data. DH, HE and SM wrote the paper. ACC, YB, HO and RG performed critical reading of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision and approved the submitted version.

### **Funding**

This work was supported by an educational grant from Aeterna-Zentaris, Inc. to HO.

### **Acknowledgments**

DH and VB are recipients of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM). ACC holds the GSK Chair in Diabetes of Université de Sherbrooke.

## References

- Ahn, J., and Kim, J. (2012) Mechanisms and consequences of inflammatory signaling in the myocardium. *Curr. Hypertens. Rep.* 14, 510-516. doi: 10.1007/s11906-012-0309-0
- Angelino, E., Reano, S., Ferrara, M., Agosti, E., Graziani, A., and Filigheddu, N. (2015) Antifibrotic activity of acylated and unacylated ghrelin. *Int. J Endocrinol.* 2015, 385682. doi: 10.1155/2015/385682
- Bairwa, S. C., Parajuli, N., and Dyck, J. R. (2016) The role of AMPK in cardiomyocyte health and survival. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 2199-2210. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.001
- Baldanzi, G., Filigheddu, N., Cutrupi, S., Catapano, F., Bonissoni, S., Fubini, A. et al., (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159, 1029-1037. doi: 10.1083/jcb.200207165
- Bessi, V. L., Labbe, S. M., Huynh, D. N., Menard, L., Jossart, C., Febbraio, M. et al., (2012) EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice. *Cardiovasc Res* 96, 99-108. doi: 10.1093/cvr/cvs225
- Broglio, F., Benso, A., Valetto, M. R., Gottero, C., Quaranta, L., Podio, V. et al., (2001) Growth hormone-independent cardiotropic activities of growth hormone-releasing peptides in normal subjects, in patients with growth hormone deficiency, and in patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy. *Endocrine.* 14, 105-108. doi: 10.1385/ENDO:14:1:105
- Broglio, F., Guarracino, F., Benso, A., Gottero, C., Prodam, F., Granata, R. et al., (2002) Effects of acute hexarelin administration on cardiac performance in patients with coronary artery disease during by-pass surgery. *Eur. J. Pharmacol.* 448, 193-200.
- Callaghan, B., and Furness, J. B. (2014) Novel and conventional receptors for ghrelin, desacyl-ghrelin, and pharmacologically related compounds. *Pharmacol. Rev.* 66, 984-1001. doi: 10.1124/pr.113.008433

- Chabot, F., Caron, A., Laplante, M., and St-Pierre, D. H. (2014) Interrelationships between ghrelin, insulin and glucose homeostasis: Physiological relevance. *World J. Diabetes* 5, 328-341. doi: 0.4239/wjd.v5.i3.328
- Chang, L., Ren, Y., Liu, X., Li, W. G., Yang, J., Geng, B. et al., (2004a) Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 43, 165-170.
- Chang, L., Zhao, J., Li, G. Z., Geng, B., Pan, C. S., Qi, Y. F. et al., (2004b) Ghrelin protects myocardium from isoproterenol-induced injury in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 25, 1131-1137.
- Choudhury, S., Bae, S., Kumar, S. R., Ke, Q., Yalamarti, B., Choi, J. H. et al., (2010) Role of AIF in cardiac apoptosis in hypertrophic cardiomyocytes from Dahl salt-sensitive rats. *Cardiovasc. Res.* 85, 28-37. doi: 10.1093/cvr/cvp261
- De Gennaro Colonna, V., Rossoni, G., Bernareggi, M., Muller, E. E., and Berti, F. (1997) Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur. J. Pharmacol.* 334, 201-207.
- Deaciuc, I. V., Alappat, J. M., McDonough, K. H., and D'Souza, N. B. (1996) Interleukin-6 tumor necrosis factor-alpha clearance and metabolism in vivo and by the isolated, perfused liver in the rat: effect of acute alcohol administration. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 20, 293-301.
- Delhanty, P. J., Huisman, M., Baldeon-Rojas, L. Y., van, d. B., I, Grefhorst, A., Abribat, T. et al., (2013) Des-acyl ghrelin analogs prevent high-fat-diet-induced dysregulation of glucose homeostasis. *FASEB J* 27, 1690-1700. doi: 10.1096/fj.12-221143
- Delhanty, P. J., Neggers, S. J., and van der Lely, A. J. (2014) Should we consider des-acyl ghrelin as a separate hormone and if so, what does it do? *Front Horm. Res.* 42, 163-174. doi: 10.1159/000358345
- Frangogiannis, N. G., Smith, C. W., and Entman, M. L. (2002) The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 53, 31-47.
- Gasco, V., Beccuti, G., Marotta, F., Benso, A., Granata, R., Broglio, F. et al., (2010) Endocrine and metabolic actions of ghrelin. *Endocr. Dev.* 17, 86-95. doi: 10.1159/000262531

- Granata, R., Isgaard, J., Alloatti, G., and Ghigo, E. (2011) Cardiovascular actions of the ghrelin gene-derived peptides and growth hormone-releasing hormone. *Exp. Biol Med. (Maywood.)* 236, 505-514. doi: 10.1258/ebm.2011.010365
- Granata, R., Settanni, F., Julien, M., Nano, R., Togliatto, G., Trombetta, A. et al., (2012) Des-acyl ghrelin fragments and analogues promote survival of pancreatic beta-cells and human pancreatic islets and prevent diabetes in streptozotocin-treated rats. *J Med. Chem.* 55, 2585-2596. doi: 10.1021/jm201223m
- Harisseh, R., Pillot, B., Gharib, A., Augeul, L., Gallo-Bona, N., Ferrera, R. et al., (2017) Unacylated ghrelin analog prevents myocardial reperfusion injury independently of permeability transition pore. *Basic Res. Cardiol.* 112, 4. doi: 10.1007/s00395-016-0595-9
- Huynh, D. N., Bessi, V. L., Menard, L., Piquereau, J., Proulx, C., Febbraio, M. et al., (2018) Adiponectin has a pivotal role in the cardioprotective effect of CP-3(iv), a selective CD36 azapeptide ligand, after transient coronary artery occlusion in mice. *FASEB J.* 32, 807-818. doi: 10.1096/fj.201700505R
- Julien, M., Kay, R. G., Delhanty, P. J., Allas, S., Granata, R., Barton, C. et al., (2012) In vitro and in vivo stability and pharmacokinetic profile of unacylated ghrelin (UAG) analogues. *Eur. J Pharm. Sci.* 47, 625-635. doi: 10.1016/j.ejps.2012.07.014
- Kewalramani, G., Puthanveetil, P., Wang, F., Kim, M. S., Deppe, S., Abrahani, A. et al., (2009) AMP-activated protein kinase confers protection against TNF- $\alpha$ -induced cardiac cell death. *Cardiovasc. Res.* 84, 42-53. doi: 10.1093/cvr/cvp166
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.
- Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* (2005) doi: 10.1152/physrev.00012.2004
- Lear, P. V., Iglesias, M. J., Feijoo-Bandin, S., Rodriguez-Penas, D., Mosquera-Leal, A., Garcia-Rua, V. et al., (2010) Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology* 151, 3286-3298. doi: 10.1210/en.2009-1205
- Li, L., Zhang, L. K., Pang, Y. Z., Pan, C. S., Qi, Y. F., Chen, L. et al., (2006) Cardioprotective effects of ghrelin and des-octanoyl ghrelin on myocardial injury induced by

- isoproterenol in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 527-535. doi: 10.1111/j.1745-7254.2006.00319.x
- Muller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J. et al., (2015) Ghrelin. *Mol. Metab* 4, 437-460. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005
- Pei, X. M., Yung, B. Y., Yip, S. P., Ying, M., Benzie, I. F., and Siu, P. M. (2014) Desacyl ghrelin prevents doxorubicin-induced myocardial fibrosis and apoptosis via the GHSR-independent pathway. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab* 306, E311-E323. doi: 10.1152/ajpendo.00123.2013
- Prabhu, S. D., and Frangogiannis, N. G. (2016) The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ. Res.* 119, 91-112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577
- Pradhan, G., Samson, S. L., and Sun, Y. (2013) Ghrelin: much more than a hunger hormone. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab Care* 16, 619-624. doi: 10.1097/MCO.0b013e328365b9be
- Saini, H. K., Xu, Y. J., Zhang, M., Liu, P. P., Kirshenbaum, L. A., and Dhalla, N. S. (2005) Role of tumour necrosis factor-alpha and other cytokines in ischemia-reperfusion-induced injury in the heart. *Exp. Clin. Cardiol.* 10, 213-222.
- Turillazzi, E., Di, P. M., Neri, M., Riezzo, I., and Fineschi, V. (2014) A theoretical timeline for myocardial infarction: immunohistochemical evaluation and western blot quantification for Interleukin-15 and Monocyte chemoattractant protein-1 as very early markers. *J. Transl. Med.* 12, 188. doi: 10.1186/1479-5876-12-188
- Veldhuis, J. D., and Bowers, C. Y. (2010) Integrating GHS into the Ghrelin System. *Int. J Pept.* 2010, doi: 10.1155/2010/879503
- Xu, J. P., Wang, H. X., Wang, W., Zhang, L. K., and Tang, C. S. (2010) Ghrelin improves disturbed myocardial energy metabolism in rats with heart failure induced by isoproterenol. *J Pept. Sci.* 16, 392-402. doi: 10.1002/psc.1253
- Xu, Z., Wu, W., Zhang, X., and Liu, G. (2007) Endogenous ghrelin increases in adriamycin-induced heart failure rats. *J Endocrinol. Invest* 30, 117-125. doi: 10.1007/BF03347409

## Legends to figures

**FIGURE 1.** UAG<sub>6-13</sub> reduced infarct area following MI/R. (A) Schematic representation of the experimental protocols. (B) Representative photomicrographs of Evans Blue and triphenyltetrazolium chloride (TTC) double stained midventricular LV slices showing the IA on the anterior section. (C) Bar graphs of % AAR/LV and (D) IA/AAR after a two-week pretreatment every 12 h with the last dose administered 30 min before myocardial ligation and 48 h reperfusion. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 6$  mice per group.  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  vs. vehicle. Scale bar, 1 mm.

**FIGURE 2.** UAG<sub>6-13</sub> reduced inflammation following MI/R. Bar graphs represent plasma IL-6 concentration at (A) 6 h and (B) 48 h of reperfusion following a 30-min LAD ligation. Bar graphs show TNF- $\alpha$  plasma concentration at (C) 6 h and (D) 48 h of reperfusion. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 9-11$  mice (6 h time point) and  $n = 6$  mice (48 h) per group.  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  vs. vehicle,  $\delta\delta P < 0.01$  vs. UAG 100 nmol/kg and  $\phi P < 0.05$  vs. UAG<sub>6-13</sub> 1000 nmol/kg.

**FIGURE 3.** UAG<sub>6-13</sub> improved cardiac metabolism and reduced apoptosis after MI/R. Bar graphs represent the relative phosphorylated to total protein ratios with representative immunoblots. (A) pThr172-AMPK $\alpha 1/\alpha 2$  (p-AMPK) to total AMPK $\alpha 1/\alpha 2$  ratios and immunoblots from cytosolic LV fractions. (B) pSer473-Akt (p-Akt) to total Akt ratios and immunoblots from total LV homogenates. (C) pSer79-ACC (p-ACC) and total ACC ratios and immunoblots from cytosolic LV fractions. (D) Cytochrome c (Cyto c) and  $\alpha$ -tubulin ratios and immunoblots from cytosolic LV fractions. (E) AIF and  $\alpha$ -tubulin ratios and immunoblots from cytosolic LV fractions. Relative band density ratios were normalized to the vehicle-treated group. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 3$  mice per treatment group.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  vs. vehicle,  $\#P < 0.05$  vs. UAG 100 nmol/kg.

**FIGURE 4.** UAG<sub>6-13</sub> preserved cardiac function in isolated hearts subjected to 40 min of low-flow ischemia and reperfusion in a GHSR1a-independent manner. (A) LV rate-pressure product (RPP) before, during and after reperfusion in the presence of either 1  $\mu$ M AG or 30  $\mu$ M UAG<sub>6-13</sub> with or without 10  $\mu$ M D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6. (B-G) Bar graphs of cardiac hemodynamic

parameters at 10 min post-ischemia: (B) RPP, (C) left ventricular–developed pressure, (D) heart rate, (E) dp/dt max, (F) dp/dt min and (G) coronary flow. Data are mean  $\pm$  SEM of n = 4–5 hearts per group. A two-way ANOVA was performed, followed by Student-Newman-Keuls' post hoc comparisons. There was no interaction between time and treatment. \*P < 0.05 vs. AG + D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, by two-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' post hoc comparisons, \*P < 0.05 vs. AG + D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6, by one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' *post hoc* comparisons, #P < 0.05 vs. AG by one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' *post hoc* comparisons.

**Table 1. Hemodynamic measurements at 6 h after myocardial ischemia caused by a 30 min coronary artery ligation in mice.**

<i>Parameter</i>	<i>Treatment</i>		
	<i>0.9% NaCl</i>	<i>UAG 100 nmol/kg</i>	<i>UAG<sub>6-13</sub> 3,000 nmol/kg</i>
BW, g	24.9 ± 0.7	25.5 ± 1.3	25.4 ± 0.7
HR, min <sup>-1</sup>	400 ± 15	410 ± 15	436 ± 15
SV, μL	10 ± 1	12 ± 1	14 ± 1*
CO, mL/min	4.0 ± 0.4	5.2 ± 0.5	6.3 ± 0.4**
Ea, mmHg/μL	6.3 ± 0.5	6.2 ± 0.6	5.3 ± 0.4
SVR, mmHg min/mL	16 ± 2	16 ± 2	13 ± 1
<b>Systolic indices</b>			
EF, %	64 ± 4	77 ± 3**	82 ± 2**
ESP, mmHg	61 ± 3	75 ± 5**	76 ± 3*
ESV, μL	6.5 ± 0.3	4.7 ± 0.3***	4.5 ± 0.3***
dP/dt max, mmHg/s	4,408 ± 227	5,885 ± 463**	6,517 ± 313***
SW, mmHg μL	505 ± 56	781 ± 82*	916 ± 81**
PRSW, mmHg	49 ± 2	73 ± 5***	68 ± 4**
Ees, mmHg/μL	8.1 ± 1.3	12.0 ± 2.2	10.2 ± 1.6
Ea/Ees	0.89 ± 0.09	0.57 ± 0.05*	0.61 ± 0.09*
<b>Diastolic indices</b>			
EDP, mmHg	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.4	3.8 ± 0.6
EDV, μL	14.9 ± 0.5	15.2 ± 0.9	16.8 ± 0.8
dP/dt min, mmHg/s	-3,725 ± 218	-5,027 ± 471**	-5,479 ± 266**
EDPVR, mmHg/μL	0.35 ± 0.04	0.39 ± 0.04	0.35 ± 0.05
tau, ms	13.3 ± 0.7	11.5 ± 1.2	10.0 ± 0.6*

*Table 1.* Mice were randomized to *one* of three study groups ( $n = 9-11$  per group) and treated twice per day at 12 h interval. BW, body weight; HR, heart rate; SV, stroke volume; CO, cardiac output; Ea, arterial elastance; Ees, end-systolic elastance; SVR, systemic vascular resistance; EF, ejection fraction; ESP, end systolic pressure; ESV, end systolic volume;  $dP/dt$  max (or min), maximal rate of pressure increase (or decline); SW, stroke work; PRSW, preload recruitable stroke work; EDP, end diastolic pressure; EDV, end diastolic volume; EDPVR, end-diastolic pressure-volume relationship; tau, time constant of relaxation (varying asymptote method). Data are mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA was applied for comparisons with the Student-Newman-Keuls *post hoc* comparisons. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  vs. vehicle-treated mice.

Figure 1.

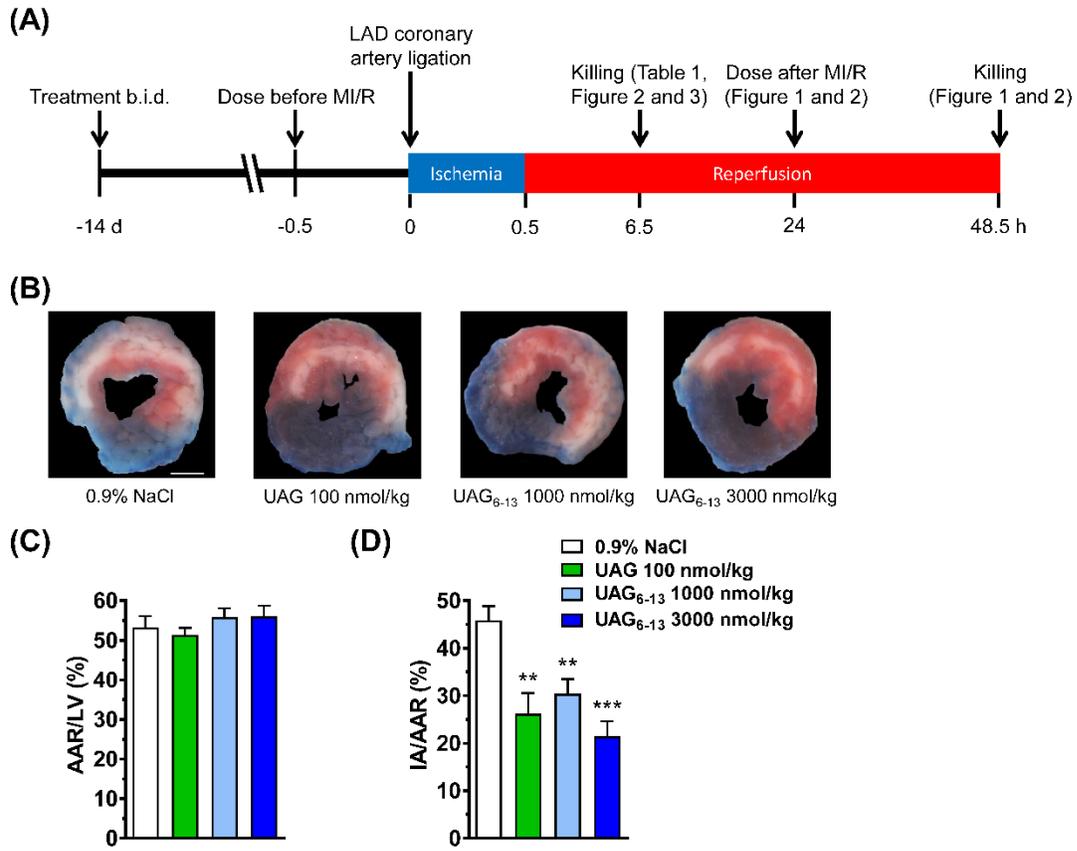


Figure 1

Figure 2.

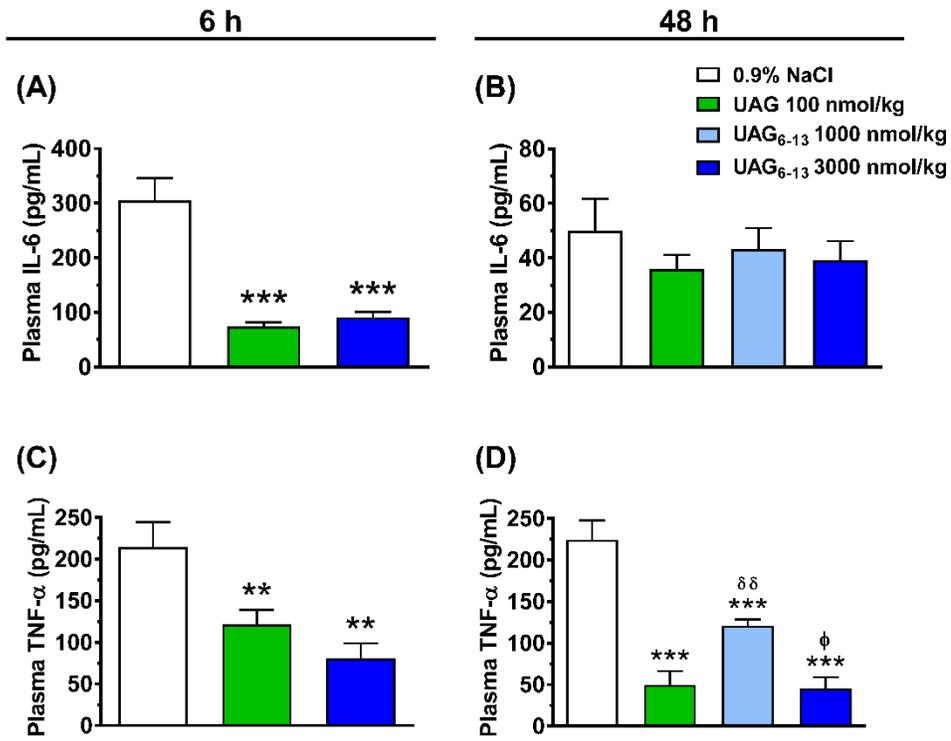


Figure 2

Figure 3.

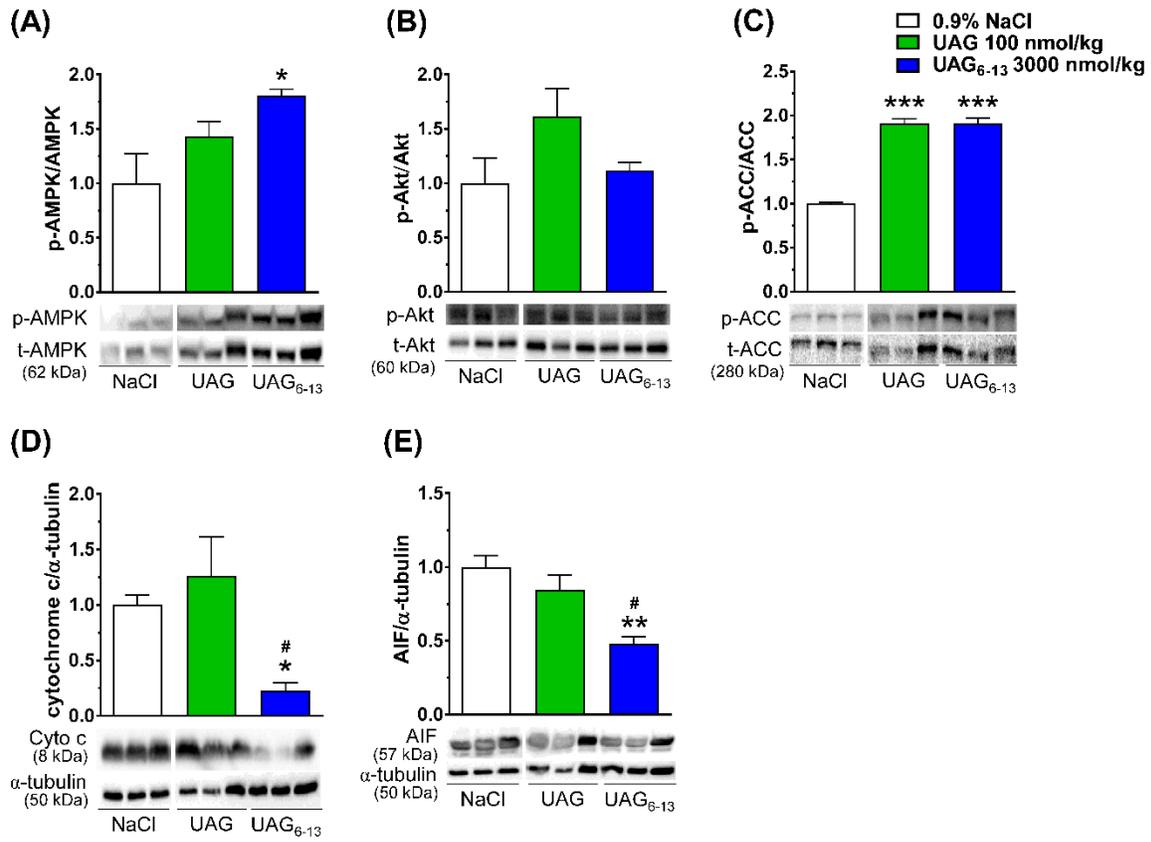
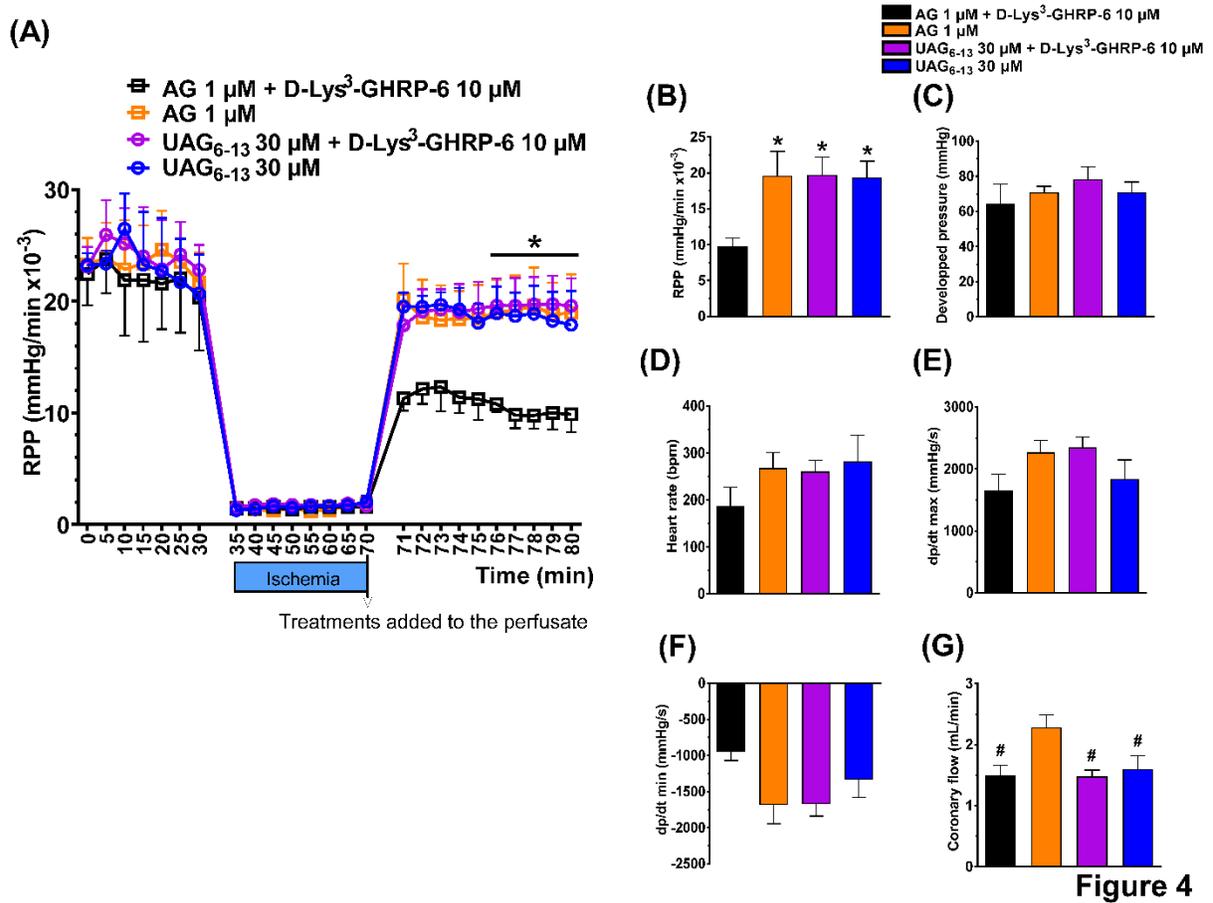
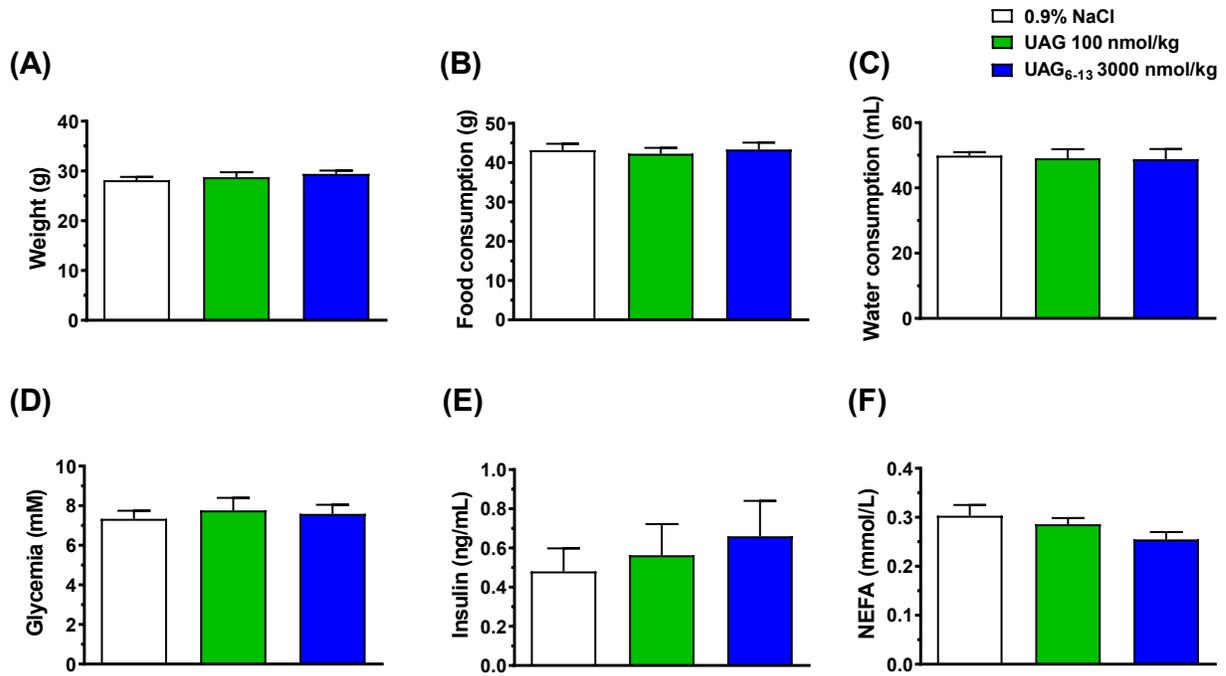


Figure 3

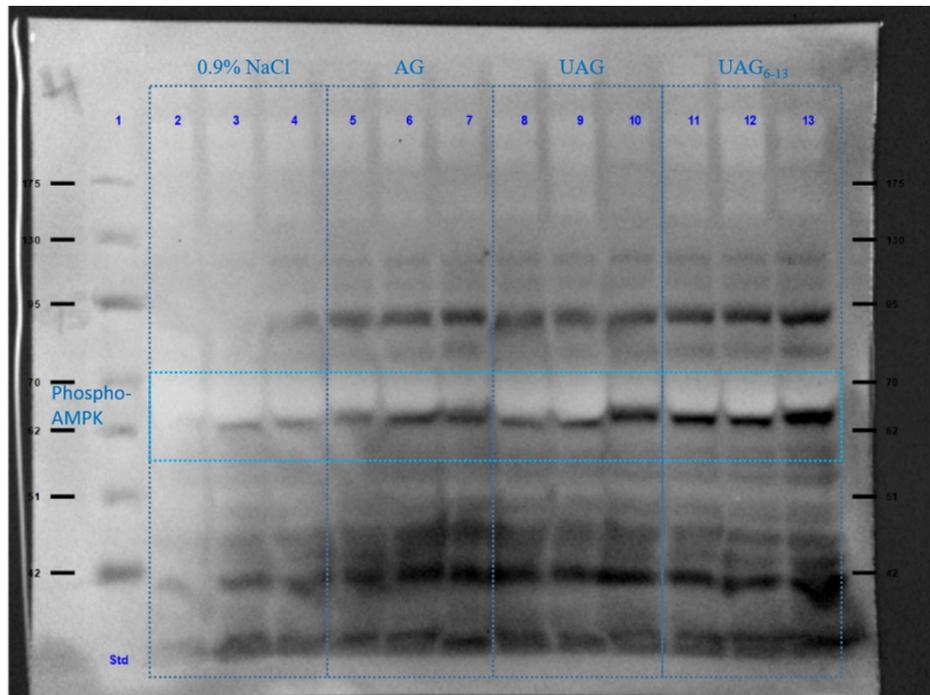
Figure 4.



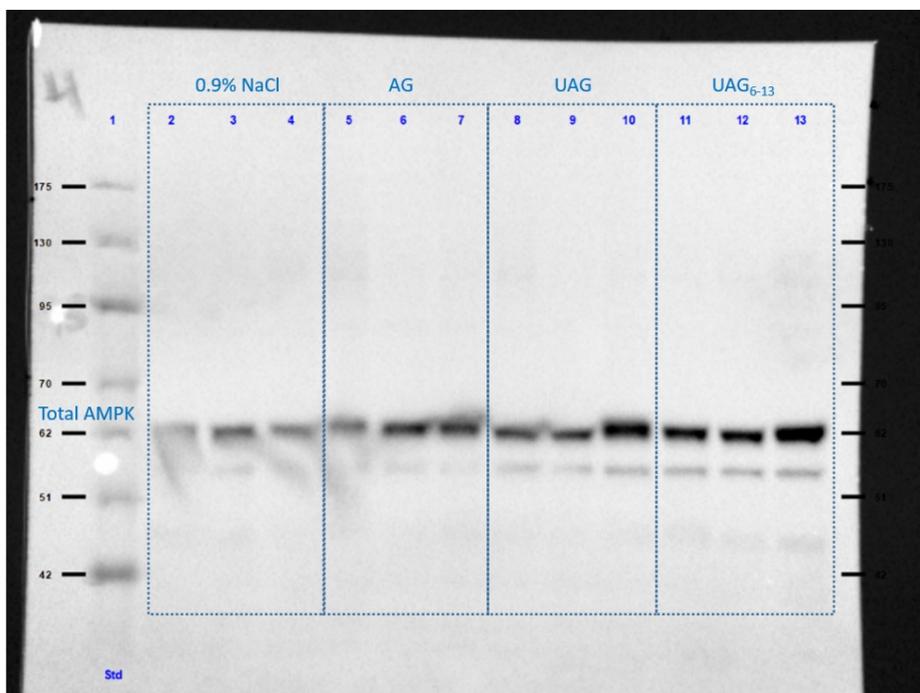
## Supplemental Figure



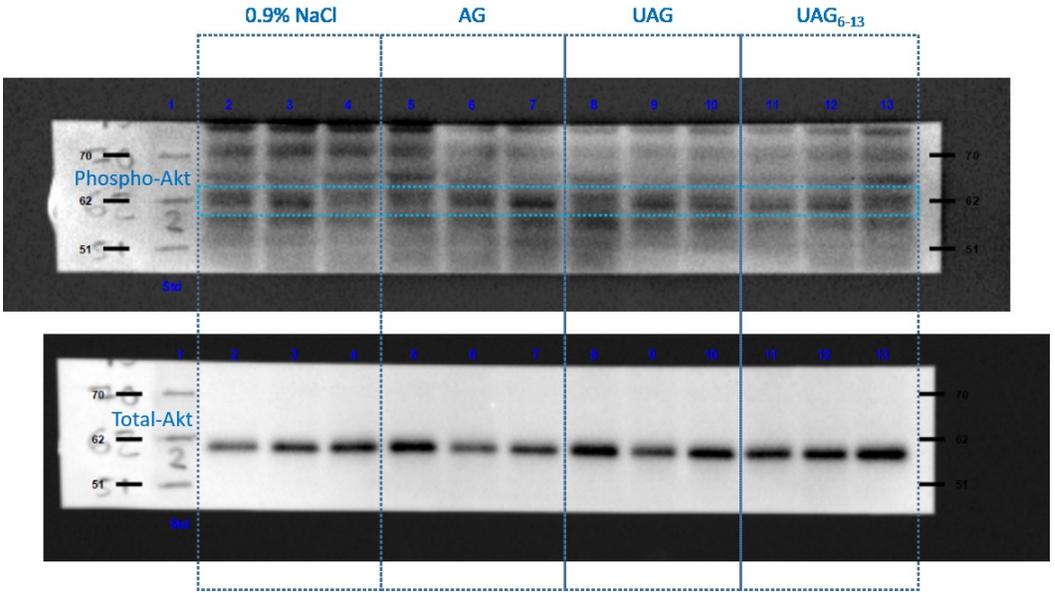
**Supplemental Figure 1.** Biochemical parameters in mice treated for 2 weeks with UAG (100 nmol/kg) or UAG<sub>6-13</sub> (3,000 nmol/kg), with the last dose given 30 min prior to transient left coronary artery ligation (LCAL). (A) Body weight after 14 days of treatment. (B) Food and (C) Water consumption over the last 7 days of treatment initiation. (D) Glycemia, (E) Insulin levels and (F) NEFA plasma concentration were measured after 6 h of reperfusion following 30 min of myocardial ischemia. Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 8$  mice per treatment group and analyzed by one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls' *post hoc* comparisons.



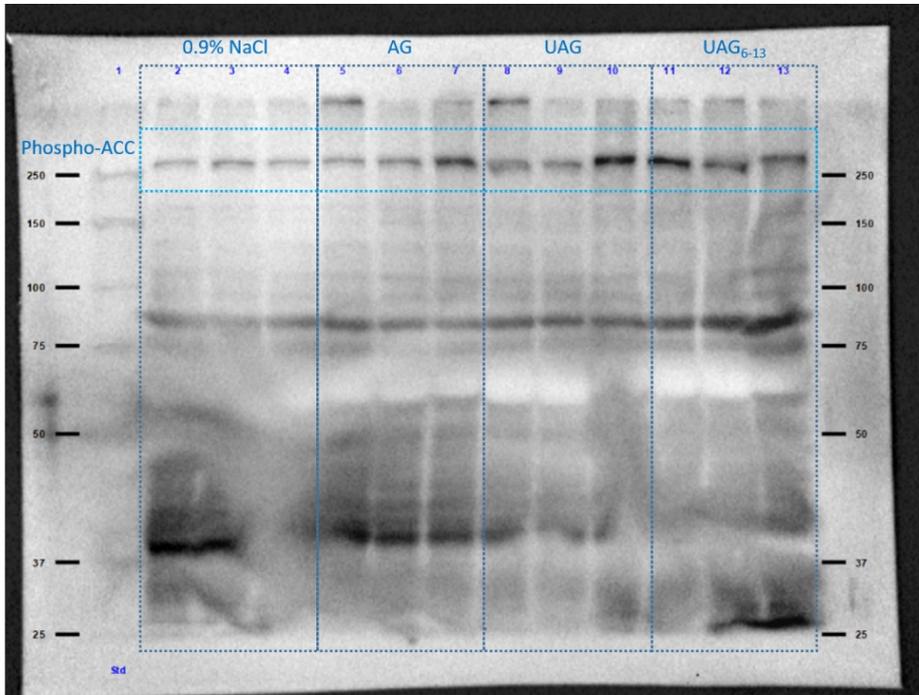
**Supplemental Figure 2.** Representative Western blot showing the levels of phospho-AMPK (62 kDa) in heart tissue cytosolic fraction.



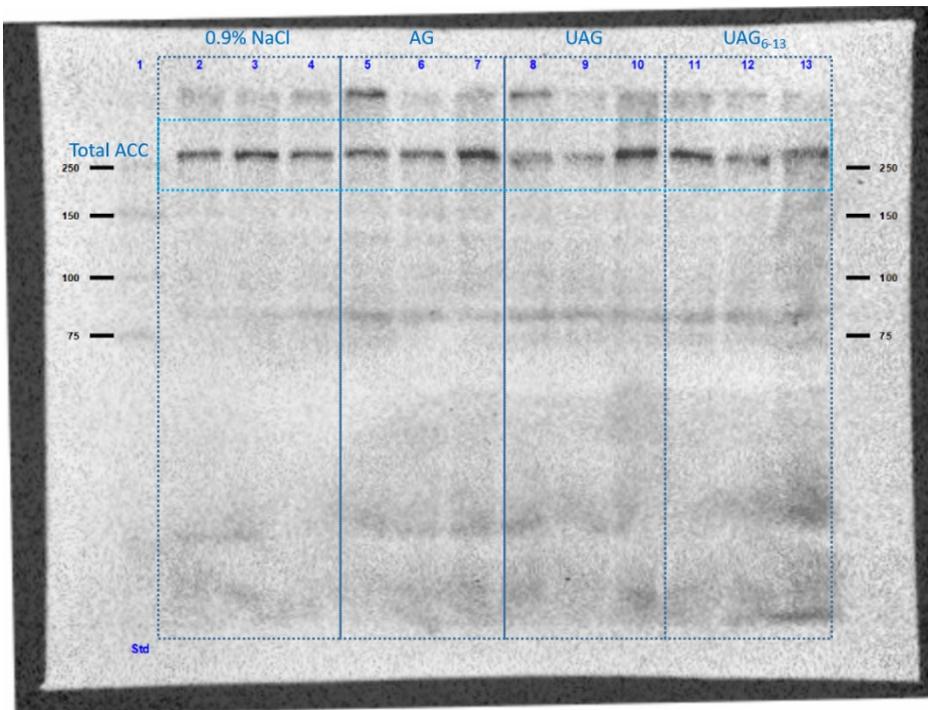
**Supplemental Figure 3.** Representative Western blot showing the levels of total-AMPK (62 kDa) after stripping of phospho-AMPK.



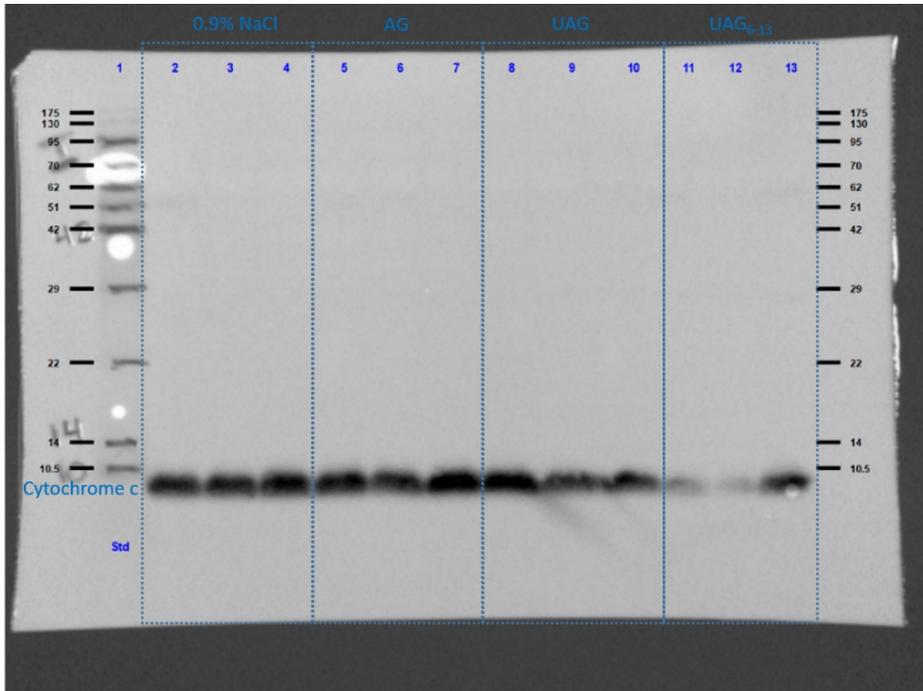
**Supplemental Figure 4.** Representative Western blot showing the levels of phospho-Akt (60 kDa) in heart tissue total homogenate and of total-Akt (60 kDa) after stripping of the membrane.



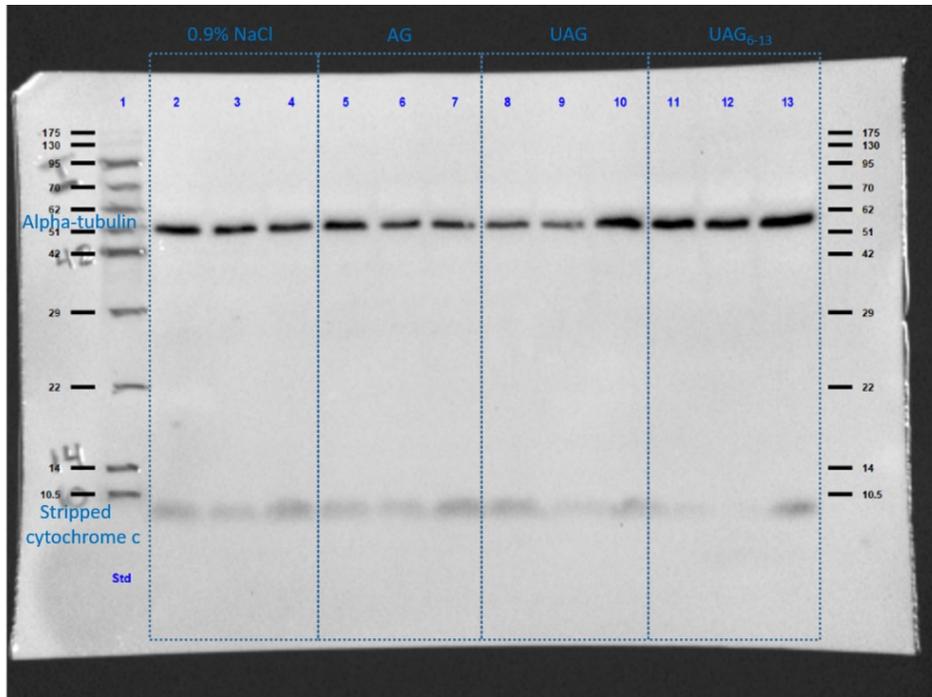
**Supplemental Figure 5.** Representative Western blot showing the levels of phospho-ACC (280 kDa) in heart tissue cytosolic fraction.



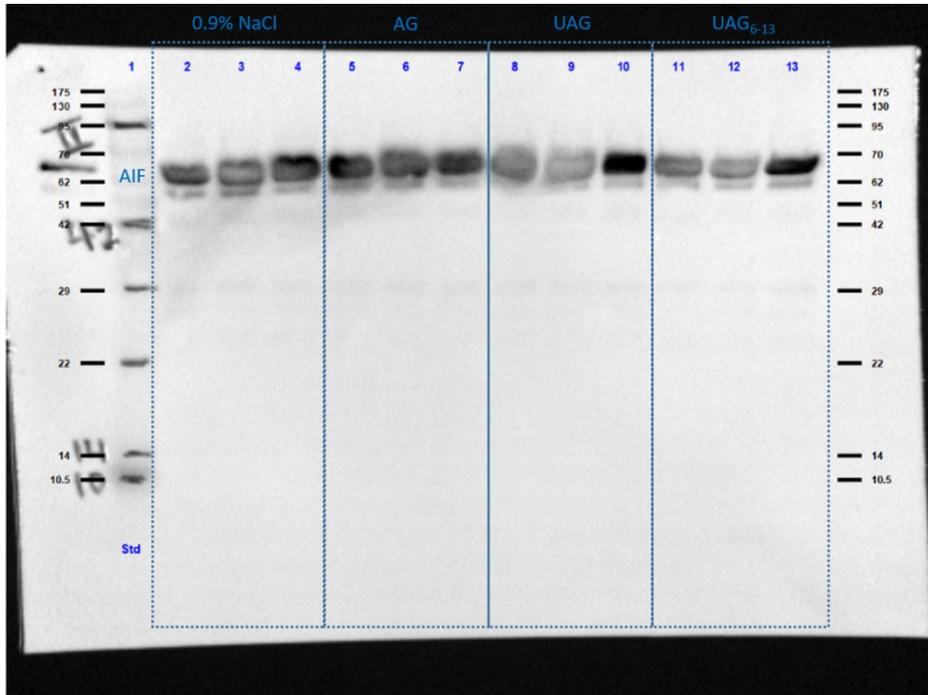
**Supplemental Figure 6.** Representative Western blot showing the levels of total-ACC (280 kDa) after stripping of phospho-ACC.



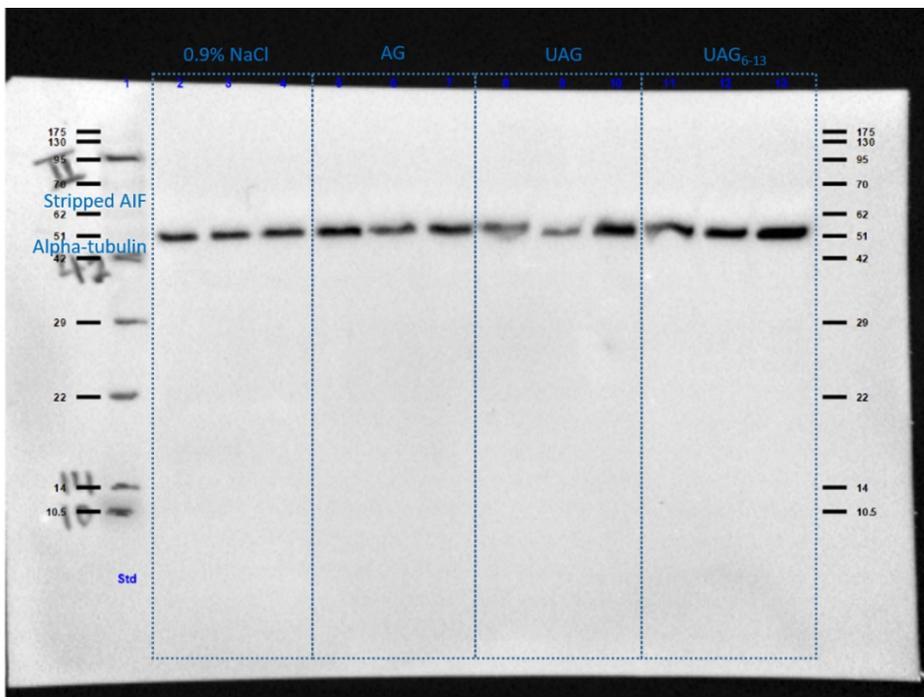
**Supplemental Figure 7.** Representative Western blot showing the levels of cytochrome c (8 kDa) in heart tissue cytosolic fraction.



**Supplemental Figure 8.** Representative Western blot showing the levels of  $\alpha$ -tubulin (50 kDa) after stripping of cytochrome c.



**Supplemental Figure 9.** Representative Western blot showing the levels of AIF (57 kDa) in heart tissue cytosolic fraction.



**Supplemental Figure 10.** Representative Western blot showing the levels of  $\alpha$ -tubulin (50 kDa) after stripping of AIF.

## **Chapitre 4 : DISCUSSION**

## 4.1 L'ischémie/reperfusion du myocarde chez un modèle murin

La maladie coronarienne est l'une des principales causes de mortalité dans le monde et à chaque année, plus de sept millions de personnes meurent de cette maladie (Wang et coll., 2016). L'IAM avec élévation du segment ST représente environ 30% de tous les cas de maladies coronariennes (Benjamin et coll., 2017; Wang et coll., 2016) et possède le plus haut taux de mortalité, soit de 5 à 8% dépendamment de la rapidité de la reperfusion suivant l'IAM. En effet, l'IAM se produit à la suite de l'occlusion d'une artère coronaire, ce qui empêche l'apport d'oxygène et de nutriments dans la région affectée et mène éventuellement à la mort cellulaire. La reperfusion de la région infarctée est essentielle à la survie des cellules, mais peut paradoxalement augmenter les dommages qui peuvent représenter jusqu'à 50% de la taille de l'infarctus après une I/RM (Bagai et coll., 2014). Le taux de mortalité après les 30 jours suivant une IAM varie entre 5 et 13%, alors que le taux de mortalité après cinq années chez les patients qui développent une insuffisance cardiaque après une IAM est d'environ 40%. Aux États-Unis, les coûts d'hospitalisation pour les patients souffrant d'un IAM et qui développent une insuffisance cardiaque sont estimés à 30 milliards de dollars pour l'année 2012 (Benjamin et coll., 2017). Les stratégies actuelles pour traiter les patients qui ont subi un IAM ont pour but de rapidement induire la reperfusion par 1) l'intervention coronaire percutanée (ou angioplastie coronaire) qui consiste à insérer un stent (ou endoprothèse) lors de la dilatation du vaisseau en gonflant un ballon 2) la fibrinolyse avec des agents spécifiques à la fibrine, tels que l'altéplase et la ténecteplase. Les agents anti-thrombotiques qui sont administrés lors de la thérapie de reperfusion incluent 1) des antiplaquettaires, tels que le clopidogrel, le ticagrélor ou le prasugrel qui inhibent le récepteur P2Y<sub>12</sub>, combinés avec l'aspirine qui inhibe la cyclooxygénase-1 (COX-1) responsable de la production de la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 2) des anticoagulants, tels que l'énoxaparine et autres molécules, qui sont des héparines de faible poids moléculaire qui inactivent le facteur de coagulation IIa (ou thrombine) et le facteur X activé. Les traitements de routine chez les patients ayant un infarctus sont 1) les statines qui réduisent les taux circulants de lipides et de cholestérol de type LDL 2) les bêta-bloqueurs afin de réduire la pression artérielle élevée et la tachycardie 3) les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (sartans) qui bloquent les effets vasoconstricteurs de l'angiotensine II 4) les antagonistes de l'aldostérone (anti-aldostérones) qui

possèdent des effets diurétiques, ce qui aura pour conséquence une diminution de la pression artérielle (Ibanez et coll., 2018). Les traitements antihypertenseurs ont principalement pour but de diminuer la post-charge, diminuant ainsi la dysfonction cardiaque et le remodelage cardiaque après un infarctus, tandis que les statines préviennent la formation et les complications liées aux plaques athéromateuses. Toutefois, ces traitements ne peuvent pas être appliqués dans tous les cas. Par exemple, les statines sont contre-indiquées chez les patients atteints de défaillance cardiaque, les bêta-bloqueurs ne peuvent pas être administrés chez les patients hypotendus, les IECA et les sartans ne peuvent pas être administrés chez les patients qui présentent une hypovolémie, et les anti-aldostérones ne peuvent pas être administrés chez les patients atteints d'une insuffisance rénale (Banach et coll., 2015). De plus, la majorité des traitements utilisés ne diminuent pas la mortalité de plus de 30%. C'est pourquoi il est important de découvrir des nouvelles thérapies qui protègent le myocarde des dommages liés à une I/RM.

Dans notre laboratoire, nous travaillons depuis longtemps avec les sécrétagogues des GHRPs qui peuvent lier le récepteur de la ghréline. Initialement associés à leurs effets sur la sécrétion des HC, il a été découvert par la suite que les GHRPs possèdent des effets cardioprotecteurs indépendants des HC. Le groupe de Ong a identifié le CD36 comme récepteur pouvant lier les GHRPs. De plus, l'UAG (ghréline désacylée) possède aussi des propriétés cardioprotectrices contrairement aux déclarations initiales qui la considéraient comme étant un agent biologique inactif puisqu'elle n'induit pas la relâche de l'HC. Le but de cette thèse est d'identifier de nouvelles avenues thérapeutiques prometteuses pour le traitement de l'infarctus du myocarde.

Nous avons utilisé la souris comme modèle animal dans nos études. Il est évident que le cœur de la souris comporte des différences avec le cœur humain, telles que la haute fréquence cardiaque de 600 battements par minute chez la souris, en comparaison avec 70 battements par minute chez l'humain. De plus, son petit volume fait de sorte que durant l'occlusion de l'artère coronaire, une petite quantité d'oxygène et de nutriments arrivent tout de même à se rendre à la zone à risque par diffusion (Ibanez et coll., 2015). Les souris ne développent donc pas plus que 70% d'infarctus dans la zone à risque, et ce, même lors d'une occlusion permanente de l'artère coronaire (Michael et coll., 1995). Toutefois, leurs anatomies sont très similaires (Wessels et

Sedmera, 2003) et le cœur humain possède un nombre similaire de vaisseaux coronariens collatéraux qui peuvent limiter la taille de l'infarctus. En effet, les artères collatérales fournissent une source alternative d'apport sanguin à la région du cœur qui est affectée par une occlusion de l'artère coronaire et peut aider à préserver sa fonction contractile. Parmi les autres modèles animaux, les chiens et les chats présentent aussi une circulation collatérale très similaire aux humains; au contraire, les rats, les lapins, les cochons et les primates présentent une circulation collatérale au moins 25% plus faible, tandis que les cobayes possèdent une circulation collatérale au moins deux fois supérieure à l'humain et ne développent pratiquement pas d'infarctus suite à une occlusion de la LAD (Schaper et coll., 1988; Seiler et coll., 2013).

On a choisi d'utiliser des souris C57BL/6 mâles âgées de trois mois. À cet âge, les souris ont développé une maturité qui représente l'équivalent d'un humain de 20 ans. Le genre de l'animal affecte aussi la progression de la pathologie, puisque des études chez les souris femelles ont montré qu'après un IAM, il y a une infiltration moins importante de leucocytes de manière aiguë, une augmentation de myofibroblastes et de néovascularisation, ainsi qu'une amélioration de la fonction cardiaque, dont la fraction d'éjection et la contractilité indépendante de la charge, par comparaison aux mâles (Shioura et coll., 2008; Wang et coll., 2007). Les souris utilisées sont aussi de type sauvage et en bonne santé. Il est évident qu'en clinique, plusieurs comorbidités, telles que la vieillesse, le diabète, l'obésité et le tabagisme sont présents et affectent la sévérité de l'IAM. Toutefois, il est préférable de faire des études chez des animaux auxquels on induit une pathologie avant d'induire d'autres dysfonctions, facilitant l'interprétation des effets d'un traitement pharmacologique. L'ajout de différents facteurs de comorbidités peut se faire progressivement par la suite.

La souris présente un avantage intéressant pour la facilité à modifier son génome afin de générer des lignées qui sont déficientes ou surexprimant un gène afin d'étudier son impact dans une condition donnée, pouvant induire une pathologie ou encore permettant de confirmer le rôle du récepteur étudié. Dans notre cas, l'utilisation de souris déficientes en CD36 en parallèle avec les souris C57BL/6 de même portée dans nos études nous permet d'évaluer si les effets de nos ligands dépendent exclusivement du récepteur CD36. De plus, la déficience d'un gène uniquement dans un organe précis et plus récemment, l'utilisation du système *Cre/lox* qui

permet d'induire l'invalidation d'un ou plusieurs gènes dans un organe à un moment et pour une période désirée, permettent d'étudier le rôle de la protéine sans les effets potentiellement confondants d'une déficience globale d'un gène tel que l'impossibilité du développement fœtal, fait de ce système un modèle très attrayant pour la recherche. Il ne faut pas exclure le fait que les souris ont un cycle de reproduction très rapide et que leurs coûts de maintien sont faibles en comparaison avec les animaux de plus grosse taille, ce qui permet d'obtenir un nombre d'animaux satisfaisant par groupe et des résultats dans un délai plus court (Zaragoza et coll., 2011). Les avantages précédents font de la souris un modèle de choix dans les laboratoires, et par conséquent, il existe un large éventail de données chez la souris dans les articles publiés. Ceci rend plus accessible la possibilité de comparer ses résultats avec ceux des autres.

Le modèle d'I/RM a été choisi parmi tant d'autres maladies cardiovasculaires, telles que l'AVC, l'hypertension pulmonaire ou l'insuffisance cardiaque, parce que l'IAM avec élévation du segment ST représente la forme avec le plus haut taux de mortalité et il n'existe présentement aucun agent pharmacologique satisfaisant pour diminuer les dommages induits par la reperfusion (Hausenloy et coll., 2017). Parmi les différentes techniques pour induire l'IAM, nous avons opté pour la ligature de la LAD par une chirurgie. Bien qu'il existe plusieurs autres méthodes d'induire l'IAM, par exemple, la cryogénie qui consiste à appliquer un instrument refroidi à l'azote liquide sur une région du myocarde, la méthode électrique qui consiste à cautériser une région du myocarde ou encore l'utilisation d'un agent pharmacologique comme l'isoprotérénol ou la doxorubicine qui, à une dose élevée, induit la nécrose des cardiomyocytes, la ligature de la LAD par une chirurgie demeure le modèle le plus utilisé, le mieux défini et qui se rapproche le plus des événements cliniques (Zaragoza et coll., 2011). En effet, les méthodes de cryogénie ou de cautérisation induisent la nécrose par la génération de cristaux de glace et la rupture de la membrane sarcoplasmique ou un changement physique, respectivement, alors que les agents pharmacologiques induisent une nécrose des cardiomyocytes qui mène rapidement au développement de l'insuffisance cardiaque, de manière similaire à la ligature permanente, contrairement à la ligature transitoire de la LAD qui induit une mort cellulaire principalement par apoptose (Hashmi et Al-Salam, 2015 ; Ibanez et coll., 2015). De plus, les dommages par cryogénie et cautérisation sont générés à partir de la surface épocardiale et progressent vers l'endocarde, alors que c'est le cas contraire dans un infarctus induit par l'ischémie. Un autre

désavantage de la cryogénie et de la cautérisation est que ces méthodes génèrent des dommages variables d'un laboratoire à un autre puisque la région, la durée, la pression, le délai et le nombre de répétitions de l'application de l'instrument sur le myocarde peuvent varier (Lindsey et coll., 2018).

La ligature de la LAD se fait à une distance de 1 mm en dessous de l'atrium gauche afin de générer une région à risque d'environ 50 à 60% du volume du ventricule gauche. La durée de l'ischémie varie entre 20 min à 60 min dans la littérature. Une ischémie d'une durée plus courte que 15 min induit des dommages qui peuvent être totalement réversibles après la reperfusion. Nous avons choisi une période de 30 min d'ischémie parce que c'est la durée la plus utilisée dans la littérature et qu'elle permet d'induire une région infarctée de 40 à 50% de la région à risque après 48 h de reperfusion. En effet, la taille de l'infarctus est considérée comme étant le principal critère dans la pathologie de l'I/RM. La reperfusion du tissu cardiaque amène les neutrophiles et les monocytes plus rapidement dans la région infarctée, augmentant à la fois une réponse inflammatoire plus accrue et une clairance des cardiomyocytes nécrosés. La phagocytose des cellules nécrosées par les macrophages, via le récepteur CD36, conduit à la résolution de l'inflammation et le recrutement de myofibroblastes qui sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire, dont principalement les collagènes I et III, pour cicatrifier les blessures (Lindsey et coll., 2018).

Notre modèle d'I/RM se distingue de celui de la ligature permanente de la LAD et de la constriction aortique transversale. En clinique, la reperfusion du myocarde se fait en général dans un délai de 60 à 120 min, ce qui est semblable à notre modèle d'ischémie de 30 min chez la souris suivie d'une reperfusion. La ligature permanente de la LAD est un modèle utilisé qui reproduit les dommages suite à une reperfusion qui a eu lieu après 120 min d'ischémie du myocarde chez l'homme, soit à cause de certaines contre-indications ou d'un problème de logistique, et survient en moyenne dans un cas sur cinq (Ibanez et coll., 2018). L'infarctus qui est quantifié après un délai variant entre un et quatorze jours est caractérisé par une grande région infarctée et une inflammation très prononcée dans la région infarctée et la région à risque. On observe un amincissement des parois, une augmentation de la dimension et des volumes du ventricule gauche et une diminution de la fraction d'éjection. Les conséquences de la ligature

permanente peuvent aussi être évaluées entre quatre et huit semaines plus tard pour étudier le remodelage à long terme du ventricule gauche. Le modèle de ligature permanente se distingue donc de l'I/RM par un remodelage associé à une dilatation accentuée et une exacerbation de la dysfonction cardiaque, résultant en une réparation moins efficace. De plus, l'administration d'un agent pharmacologique par une voie systémique lors d'une ligature permanente de la LAD dépendra presque exclusivement de la présence et de la formation de vaisseaux collatéraux pour amener le traitement dans la région infarctée (Lindsey et coll., 2018). Pour contourner cette limitation, une possibilité est l'injection de l'agent pharmacologique directement dans la région à risque du myocarde.

Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la fonction cardiaque et la morphologie du cœur. Des méthodes non-invasives, telles que l'échocardiographie, l'imagerie par résonance magnétique et la tomographie par émission de positrons sont toutes réputées pour mesurer la fonction du myocarde et les dimensions des parois du myocarde. L'échocardiographie consiste à envoyer des ultrasons qui pénètrent dans la cavité thoracique et qui sont reflétés lorsqu'ils entrent en contact avec le myocarde, les valves, les vaisseaux et le sang. La réverbération du son est captée et convertie en image en temps réel. L'échocardiographie comporte des avantages tels que sa portabilité, son coût faible, la facilité de répéter la procédure plusieurs fois sur le même sujet, mais requiert que l'analyse soit faite par une personne formée et les interprétations peuvent varier d'une personne à l'autre. L'imagerie par résonance magnétique consiste à envoyer un champ magnétique et les images générées sont de très haute résolution, faisant en sorte que les analyses sont très précises et reproductibles entre différentes personnes. La tomographie par émission de positron comporte des avantages similaires à l'imagerie par résonance magnétique, mais l'usage de substrats radiomarqués apporte un avantage additionnel, celui de pouvoir mesurer leur métabolisme (Flachskampf et coll., 2011; Gilson et Kraitchman, 2009). L'imagerie par résonance magnétique et la tomographie par émission de positron ont le désavantage d'être coûteuses et complexes. De plus, bien que les trois techniques peuvent mesurer les dimensions, les volumes et l'étendue des dommages du ventricule gauche, elles ne permettent pas de mesurer la pression du ventricule gauche. La méthode du cathéter de conductance est une technique invasive que nous avons utilisée, qui permet de mesurer simultanément les valeurs de pression et de volumes dans le ventricule gauche et de les

transposer sur un graphique de boucles de pression-volume pour chaque battement de cœur. Le principal avantage d'utiliser le cathéter de conductance est qu'il permet de mesurer la contractilité du ventricule gauche de manière indépendante de la charge et du rythme cardiaque. L'occlusion de la veine cave cause une diminution du retour veineux et de manière parallèle, de la pression systolique. La variation du volume télédiastolique permet de mesurer les relations qui existent entre la pression et le volume en fin de systole, entre le travail systolique et le volume télédiastolique, ainsi qu'entre le  $dP/dt_{max}$  et le volume télédiastolique, qui sont tous des paramètres validés pour représenter la contractilité du ventricule gauche de manière indépendante de la charge. Bien que la relation entre la pression et le volume en fin de systole soit plus facile à représenter visuellement sur le graphique des boucles de pression-volume, la relation entre le travail systolique et le volume télédiastolique est plus précise parce qu'elle ne dépend pas des valeurs absolues du volume (Lindsey et coll., 2018).

L'utilisation d'un modèle *in vivo* de ligature de la LAD nous a permis de reproduire la séquence des événements cliniques. Dans notre étude, nous avons aussi utilisé un modèle de cœur isolé en mode Langendorff *ex vivo*. Ce modèle simplifié comporte plusieurs avantages dont la possibilité de modifier à sa guise la concentration des constituants du tampon de perfusion, l'induction d'une ischémie, le contrôle de la pression et du débit de perfusion, la mesure de la fonction cardiaque et de la taille de l'infarctus, la reproductibilité des résultats, l'isolation des cardiomyocytes, l'exclusion des effets neurohormonaux et des organes périphériques sur le myocarde et permet donc d'évaluer les effets d'un agent pharmacologique directement au niveau du myocarde (Liao et coll., 2012; Olejnickova et coll., 2015). Le perfusat couramment utilisé pour le cœur isolé en mode Langendorff est un tampon Krebs qui ne contient que du glucose comme substrat énergétique. Puisque notre étude porte sur les effets des acides gras, nous avons supplémenté le perfusat avec 1,2 mM de palmitate comme dans l'article du groupe de Dyck (Kovacic et coll., 2003) et de 0,8 nM d'insuline, de 1,5 mM de lactate et de 0,2 mM de pyruvate en nous basant sur l'article du groupe de Burelle (Ascah et coll., 2011). Pour l'induction de l'ischémie, il est possible d'induire une ischémie totale ou, comme dans notre cas, une ischémie presque totale par une diminution de la perfusion à 10% du débit. L'ischémie totale représente mieux notre modèle d'IAM *in vivo*, mais augmente les chances que le cœur ne se remette pas à battre lors de la reperfusion. Nos essais préliminaires ont montré qu'environ

50% des cœurs ne recommençaient pas à battre lors de la reperfusion suite à une ischémie totale. Un moyen pour contourner ce problème est de supplémenter le perfusat, soit tout au long de l'expérience ou juste au moment de la reperfusion, avec de l'adrénaline, mais nous avons préféré ne pas ajouter un facteur qui peut affecter la fonction et le métabolisme cardiaque dans notre expérience. Pour ces raisons, nous avons choisi d'induire une ischémie en diminuant à 10% le débit de perfusion pour induire l'ischémie. Certaines études choisissent de faire des expériences en cœur isolé afin de contrôler le débit de perfusion de manière constante comme dans des pathologies qui affecteraient le débit sanguin dans un modèle *in vivo*. Dans notre cas, le cœur est perfusé à une pression constante et peut autoréguler le débit qui en découle de manière proportionnelle à sa performance actuelle. L'administration des traitements, des anticorps et des antagonistes est faite en mélangeant ceux-ci avec le tampon juste avant son entrée dans le cœur et leur concentration est maintenue constante à l'aide d'un pousse-seringue selon le débit de perfusion. Une autre différence avec notre modèle *in vivo* est que l'administration du peptide se fait au moment de la reperfusion plutôt qu'avant l'ischémie, ce qui est plus représentatif de la situation clinique.

## **4.2 Effets cardioprotecteurs de l'azapeptide CP-3(iv) dans l'I/RM**

Notre premier objectif était de montrer qu'un ligand sélectif envers le CD36, l'azapeptide CP-3(iv), possède des effets cardioprotecteurs dans la pathologie de l'I/RM et d'identifier les mécanismes moléculaires. Les travaux présentés dans cette thèse (section 3.3) montrent une diminution de la taille de l'infarctus et de la dysfonction cardiaque liée, du moins en partie, à une augmentation de l'adiponectine. En effet, les gènes impliqués dans la transcription de l'adiponectine, dont *Pparg*, *Cebpb* (gène de *CCAAT enhancer binding protein beta*) et *Sirt1* (gène de la *sirtuine 1*), ainsi que le gène de l'*Adipoq* (adiponectine) en tant que tel, sont tous augmentés au niveau du tissu adipeux chez les souris traitées avec le CP-3(iv), concordant avec la concentration élevée de l'adiponectine de haut poids moléculaire en circulation. Au niveau du myocarde, le traitement avec le CP-3(iv) diminue le stress oxydatif par la présence plus faible de ROS, l'inflammation par une augmentation de l'activité de COX-2 et augmente le métabolisme en activant l'AMPK et l'Akt, conduisant ainsi à une diminution de l'apoptose telle qu'observé par une diminution de l'activité de la caspase-3 et de la relâche

de cytochrome c mitochondriale dans le cytosol. La perfusion de cœurs isolés en mode Langendorff avec un supplément d'anticorps anti-adiponectine a permis de montrer que l'adiponectine joue un rôle important dans la récupération de la fonction cardiaque chez les cœurs perfusés avec le CP-3(iv).

Dans une étude précédente dans laquelle j'ai participé pendant mes études de maîtrise (Bessi et coll., 2012), nous avons utilisé le EP 80317, un analogue du GHRP-6, qui possède une plus faible affinité envers le récepteur de la ghréline (GHS-R1a) ( $CI_{50} = 7,50 \times 10^{-7}$  M) en comparaison avec l'hexaréline ( $CI_{50} = 1,59 \times 10^{-8}$  M); cependant, le EP 80317 et l'hexaréline présentent une affinité similaire pour le CD36 ( $CI_{50} = 1,11 \times 10^{-6}$  M pour le EP 80317 et  $CI_{50} = 2,08 \times 10^{-6}$  M pour l'hexaréline). Les résultats clés de cette étude ont montré que la taille de l'infarctus et la dysfonction cardiaque étaient diminuées en raison d'une réduction de la lipolyse diminuant ainsi les taux circulants d'AGNE chez les souris de type sauvage C57BL/6 prétraitées avec le EP 80317. Par conséquent, une quantité significativement moindre d'AGNE entre dans le myocarde. La faible concentration plasmatique d'AGNE est expliquée par un effet périphérique du EP 80317 sur le tissu adipeux, favorisant le stockage des acides gras sous forme de triglycérides et simultanément, et une diminution de la lipolyse (Bessi et coll., 2012).

Dans la première étude de cette thèse ciblant plus spécifiquement le récepteur CD36, nous avons utilisé l'azapeptide CP-3(iv), qui est aussi un analogue du GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), dans un modèle murin d'I/RM. Parmi une série d'azapeptides synthétisés, le CP-3(iv) (Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), qui présente une substitution de l'His en position 1 pour une Ala et la Trp en position 4 pour l'AzaPhe, possède une affinité d'au moins 10 fois moindre envers le récepteur de la ghréline (GHS-R1a) ( $CI_{50} = \gg 10^{-5}$  M) en comparaison avec le CD36 ( $CI_{50} = 7,58 \times 10^{-6}$  M), et une sélectivité 1000 fois supérieure envers le CD36 par comparaison à l'hexaréline (Proulx et coll., 2012). De plus, des expériences de microvaisseaux de choroïdes en culture ont montré que l'incubation avec le CP-3(iv) stimule l'angiogenèse, en comparaison avec les autres azapeptides, tels que les [azaTyr4]-GHRP-6, [Ala1, azaPhe2]-GHRP-6 et [azaLeu3, Ala6]-GHRP-6, qui inhibent l'angiogenèse (Proulx et coll., 2012). Parmi la première série d'azapeptides synthétisés, le CP-3(iv) était l'un des meilleurs composés pour

l'étude dans le modèle d'I/RM pour sa sélectivité envers le CD36 et ses propriétés pro-angiogéniques.

Nous avons d'abord montré qu'un prétraitement quotidien avec le CP-3(iv) pendant 14 jours à une dose équimolaire à celle du EP 80317 (289 nmol/kg) diminue la taille de l'infarctus après 48 h de reperfusion suivant 30 min d'ischémie. En fait, dans la pathologie de l'IAM, la taille de l'infarctus est le critère principal pour évaluer les effets cardioprotecteurs d'un agent pharmacologique (Bulluck et coll., 2016). On observe que le CP-3(iv) protège davantage le myocarde que le EP 80317 contre les dommages induits par l'I/RM, soit une réduction de 54% (RI/RAR) et de 33 % (RI/RAR) pour le EP 80317. On observe donc un effet cardioprotecteur appréciable de l'azapeptide CP-3(iv) qui est très sélectif envers le CD36. Ces résultats confirment les premières études réalisées avec l'hexaréline qui concluaient que ses effets cardioprotecteurs étaient plus liés au récepteur CD36 que du récepteur de la ghréline (Bisi et coll., 1999; Bisi et coll., 1999; Bodart et coll., 2002; Locatelli et coll., 1999; Rossoni et coll., 1998; Torsello et coll., 2003). De plus, chez les souris déficientes en CD36 traitées avec le CP-3(iv), les dommages de l'I/RM n'ont pas été changés, démontrant que l'effet cardioprotecteur du CP-3(iv) dépend du CD36. De manière similaire au EP 80317, le myocarde des souris traitées avec le CP-3(iv) a vu ses paramètres cardiaques hémodynamiques, dont le volume d'éjection, le débit cardiaque, la résistance vasculaire systémique et le travail systolique améliorées, retournant à des valeurs très proches de celles des souris témoins opérées sans ligature de l'artère coronaire « *sham* ». Ce qui distingue le CP-3(iv) du EP 80317 est la préservation de la fraction d'éjection, qui est considérée comme étant le meilleur critère suivant le critère principal (taille de l'infarctus) en clinique (Burns et coll., 2002; Chew et coll., 2018; Wittes et coll., 1989), et de la relation entre le travail systolique et le volume télédiastolique, un paramètre de contractilité indépendant de la charge. Cette amélioration des fonctions cardiaques est attribuée à une plus faible nécrose des cardiomyocytes chez les souris traitées avec le CP-3(iv). On peut noter que le traitement avec nos ligands du CD36 n'affecte pas les fonctions cardiaques des souris *sham*, en comparaison avec leur véhicule. Ceci suggère que nos ligands n'affectent pas directement l'hémodynamique et la fonction du myocarde, mais atténuent les facteurs qui perturbent la fonction contractile du cœur après une I/RM. Parmi ces facteurs, on retrouve entre autres les

ROS, l'inflammation, l'apoptose et la perturbation ionique qui conduisent à la nécrose et à la dysfonction du myocarde.

Notre étude a montré que les facteurs prédisposant à la dysfonction du VG sont diminués après un traitement avec le CP-3(iv). Plus précisément, le mécanisme cardioprotecteur du CP-3(iv) est lié à la transcription et la sécrétion de l'adiponectine. Une étude a montré que les souris déficientes en CD36 possèdent un taux circulant d'adiponectine plus faible que les souris de type sauvage, en raison d'une expression moindre du gène de l'adiponectine dans le tissu adipeux (Hajri et coll., 2007). De plus, une étude a rapporté que des humains qui présentent un polymorphisme d'un seul nucléotide dans le promoteur du CD36 (-178 A/C) ont un taux plus faible d'adiponectine en circulation (Lepretre et coll., 2004). Étant donné qu'il existe un lien entre le CD36 et l'activation du facteur de transcription PPAR $\gamma$  dans les macrophages (Avallone et coll., 2006; Bujold et coll., 2009) et le tissu adipeux (Demers et coll., 2008; Rodrigue-Way et coll., 2007), nous avons investigué si le traitement avec le CP-3(iv) pouvait induire la sécrétion de l'adiponectine au niveau du tissu adipeux. En effet, des études antérieures dans le laboratoire ont montré que l'hexaréline active le PPAR $\gamma$  dans les adipocytes 3T3-L1 en culture et le tissu adipeux, et conduit à la transcription de ses gènes cibles, dont la protéine de transport des acides gras (FATP4), le CPT1b, et le PGC-1 $\alpha$ , de manière dépendante du CD36 (Rodrigue-Way et coll., 2007). L'activation de PPAR $\gamma$  par les TZD (Lambe et Tugwood, 1996) est reconnue pour ses effets de synthèse et de stockage des TG dans le tissu adipeux, ainsi que pour la réduction de l'accumulation des lipides et la promotion de l'entrée du glucose et de l'oxydation des acides gras dans les autres tissus (Soccio et coll., 2014). Nos résultats montrent que le traitement avec le CP-3(iv) induit l'expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$ , de C/EBP $\beta$  et de SIRT1, des facteurs de transcription de l'adiponectine, à 6 h de reperfusion après une ischémie du myocarde (Guo et coll., 2017; Maeda et coll., 2001; Park et coll., 2004; Qiao et Shao, 2006). De ce fait, l'expression de l'ARNm de l'adiponectine est augmentée dans le tissu adipeux, ainsi que son taux circulant total et de haut poids moléculaire (HMW). En fait, on peut retrouver l'adiponectine sous plusieurs formes en circulation, soit de faible poids moléculaire (trimère), de poids moléculaire intermédiaire (hexamère), ou de haut poids moléculaire (multimère). La forme HMW est la plus active et corrèle mieux avec ses effets cardioprotecteurs. En effet, un ratio élevé de l'adiponectine HMW sur l'adiponectine totale corrèle positivement avec le taux

de HDL circulant et la sensibilité à l'insuline, et corrèle négativement avec les taux de TG et des marqueurs inflammatoires en circulation (Aso et coll., 2006; Komura et coll., 2008). Nos résultats montrent que non seulement il y a une augmentation de la concentration d'adiponectine totale en circulation, mais que le ratio d'adiponectine HMW sur le total est augmenté avec le traitement du CP-3(iv) à 6 h de reperfusion. Une étude a montré que la surexpression de la SIRT1 dans le tissu adipeux prévient l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux et peut s'appliquer dans des conditions d'hypoxie et de taux circulants élevés en acides gras (Gillum et coll., 2011). L'expression de SIRT1 chez les souris traitées avec le CP-3(iv) protège donc le tissu adipeux contre l'inflammation qui régule négativement l'expression de l'adiponectine (Chen et coll., 2012; Fantuzzi, 2008) et cet effet serait dépendant de l'activation de PPAR $\gamma$  (Mayoral et coll., 2015). De manière similaire avec le EP 80317, on observe une diminution des taux circulants de AGNE et une augmentation du gène de PEPCK qui est responsable de convertir l'oxaloacétate en G3P sur lequel sont transférés trois acyl-CoA pour synthétiser les TG (Ahmadian et coll., 2007). Les deux ligands du CD36 étudiés, GHRP et azapeptide, induisent donc une augmentation de l'emmagasinage des acides gras sous forme de TG dans les gouttelettes lipidiques et inhibent la lipolyse après une I/RM, ce qui diminue leur utilisation et favorise celle du glucose dans le myocarde. L'expression de l'ARNm des autres cibles de PPAR $\gamma$ , telles que le FATP1 et le CD36 qui sont responsables de l'entrée des acides gras dans la cellule, et le Nrf2 qui est responsable de la transcription des enzymes anti-oxydantes, est aussi augmentée. En effet, le Nrf2 peut être activé par l'adiponectine (Li et coll., 2015; Ren et coll., 2017), ce qui cause sa translocation dans le noyau et sa liaison sur l'élément de réponse anti-oxydant (ARE, *antioxidant response element*) pour induire la transcription des gènes qui diminuent le stress oxydatif, tels que l'HO-1, la SOD, la catalase et la GSH-Px (Chen et coll., 2014; Gorrini et coll., 2013). Une étude sur les macrophages a montré que l'activation du Nrf2 est responsable de l'expression du CD36 de manière indépendante de PPAR $\gamma$  dans la maladie de la malaria (Olagnier et coll., 2011). Il ne serait pas surprenant que l'augmentation de l'expression du gène de Nrf2 induise, de manière additionnelle ou synergique avec le PPAR $\gamma$ , l'expression du CD36 dans le tissu adipeux. Il est à noter que les effets du CP-3(iv), comme ceux du EP 80317 d'ailleurs, sur le tissu adipeux sont transitoires, puisque la différence sur l'expression des gènes à 6 h de reperfusion entre les souris traitées avec les ligands du CD36 et celles traitées avec le véhicule n'est plus observée à 48 h de reperfusion (résultats non montrés).

Par conséquent, la concentration d'adiponectine totale et le ratio de HMW sur total sont similaires entre les deux groupes à 48 h de reperfusion.

Il est bien établi que la génération de ROS est amplifiée lors de la reperfusion après une ischémie du myocarde et contribue aux dommages à la reperfusion (Granger et Kvietys, 2015; Raedschelders et coll., 2012; Zhou et coll., 2018; Zweier et Talukder, 2006). En effet, les ROS peuvent induire l'apoptose en provoquant l'ouverture du PTPm, la relâche de facteurs pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c et l'AIF (*apoptosis inducible factor*) et l'activation de la caspase-3 (Lesnefsky et coll., 2017), ou encore causent la mort cellulaire en s'attaquant à la membrane sarcoplasmique (Nicotera et Melino, 2004). Nos résultats montrent que la production de ROS par la NADPH oxydase est diminuée de moitié chez les souris traitées avec le CP-3(iv), ainsi qu'une diminution des ROS produits par la chaîne de transport d'électron. Ces résultats sont confirmés par une plus grande activité de l'aconitase, une enzyme sensible à la présence de ROS (Lushchak et coll., 2014). Par conséquent, les mitochondries sont moins endommagées et la relâche de cytochrome c dans le cytosol, ainsi que l'activité de la caspase-3, sont diminuées. Ces effets peuvent être attribués à l'adiponectine, puisque son administration sous forme globulaire 10 min avant la reperfusion du myocarde diminue l'expression de iNOS et celle de la sous-unité NOX2 de la NADPH oxydase, accompagnée d'une baisse de la production de NO et de superoxyde, diminue l'activité de la caspase-3 et l'apoptose, diminue la taille de l'infarctus et améliore la fraction d'éjection (Tao et coll., 2007; Wang et coll., 2012). De plus, plusieurs études ont montré une activation de l'AMPK suite à l'administration de l'adiponectine dans le modèle d'I/RM (Fang et coll., 2010; Ma et coll., 2011; Shibata et coll., 2005). Une étude avec le modèle de cœur isolé de rat a montré que l'administration d'adiponectine sous forme globulaire au moment de l'ischémie pour une période de 30 min active l'Akt dès le début de la reperfusion, et l'AMPK et eNOS seulement 60 min après la reperfusion (Gonon et coll., 2008). Nos résultats montrent une augmentation de l'activité d'Akt, et une augmentation plus modeste de l'AMPK, menant à l'inhibition de Bad et de Bax et à une diminution additionnelle de l'apoptose (Hausenloy et Yellon, 2004; Zha et coll., 1996). L'étude de Shibata et coll. a montré que l'adiponectine active COX-2, conduisant à la production de PGE<sub>2</sub> qui inhibe la production de TNF- $\alpha$  (Shibata et coll., 2005). Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire qui peut activer la voie NF $\kappa$ B et induire l'apoptose (Kleinbongard et coll., 2011). Encore une fois,

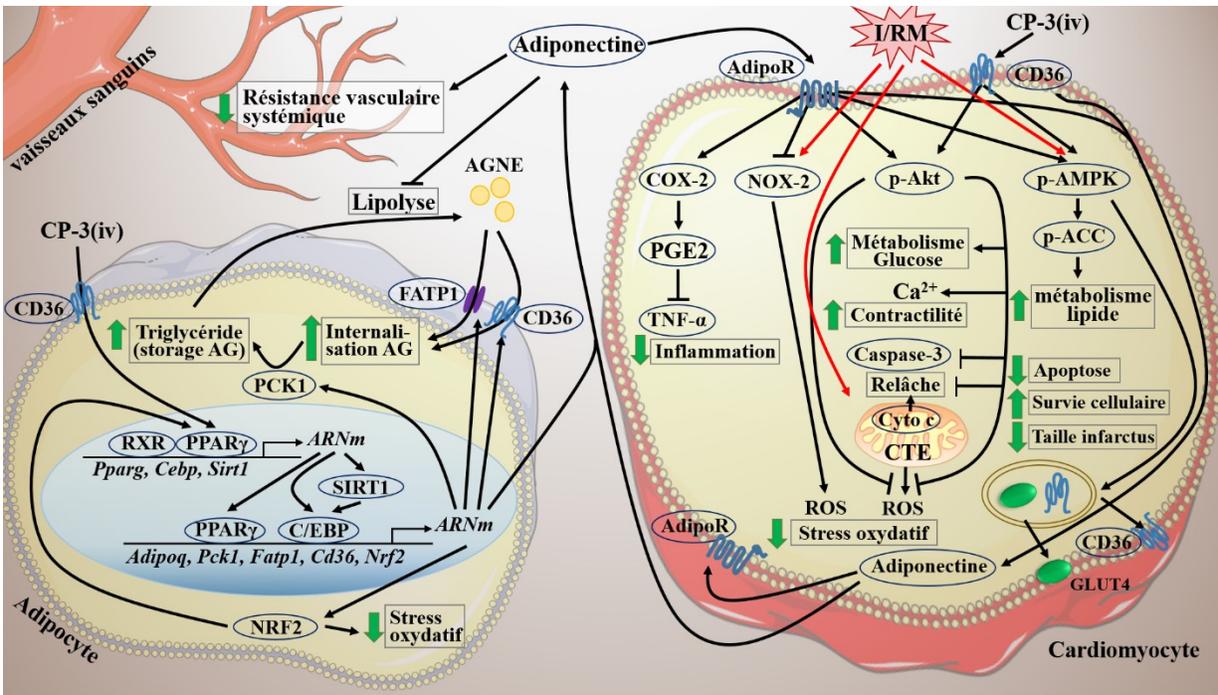
l'augmentation de l'expression de COX-2 par le traitement avec le CP-3(iv) constitue une autre voie qui mène à l'inhibition de l'apoptose.

L'activation d'AMPK et d'Akt a aussi des répercussions sur le métabolisme. l'Akt peut induire la translocation de GLUT4 (Luiken et coll., 2015; Steinbusch et coll., 2011), tandis que l'AMPK peut induire la translocation du CD36 et de GLUT4 qui sont contenus dans les vésicules vers la membrane sarcoplasmique (Chanda et coll., 2016; Schwenk et coll., 2010) en plus d'inhiber l'activité des ACC1 et ACC2. Nous pouvons donc déduire que le traitement avec le CP-3(iv), après une I/RM, augmente l'entrée et l'oxydation du glucose, de même que pour les acides gras, ce qui diminue son stockage sous forme de TG qui a un effet inhibiteur de l'IRS-1, et prévient le développement de la résistance à l'insuline (Liu et coll., 2017).

La majorité de ces résultats sont basés sur un prétraitement quotidien de 14 jours avec le CP-3(iv) avant l'évènement d'une I/RM. Afin de nous rapprocher d'une situation en clinique où le patient est déjà atteint d'une IAM, nous avons fait une étude pilote en injectant le CP-3(iv) seulement à 10 min avant la reperfusion, ainsi que 24 h plus tard. Nos résultats montrent qu'un traitement à la dose équimolaire au EP 80317 (289 nmol/kg) n'est pas suffisant pour réduire la taille de l'infarctus. Toutefois, en augmentant la dose à 1000 nmol/kg, on parvient à réduire la taille de l'infarctus de presque 50%. Ces résultats renforcent la possibilité d'exploiter le récepteur CD36 comme cible thérapeutique dans la pathologie de l'I/RM à l'aide des azapeptides en optimisant la dose administrée.

Des études ont montré que l'adiponectine peut être synthétisée et sécrétée par les cardiomyocytes, conférant ses effets cardioprotecteurs non seulement par voie endocrine, mais aussi par voie paracrine et autocrine (Amin et coll., 2010; Dadson et coll., 2011; Pineiro et coll., 2005; Wang et coll., 2010). Afin de délimiter l'influence des organes périphériques suite au traitement avec le CP-3(iv), nous avons utilisé le modèle de cœur isolé en mode Langendorff avec induction d'une ischémie en réduisant le débit à 10% suivi d'une reperfusion. Une étude sur les effets antidépressifs de l'adiponectine a fait usage d'un anticorps contre l'adiponectine suite à une injection intracérébroventriculaire *in vivo* (Liu et coll., 2012), alors qu'une autre étude a incubé des myotubes C2C12 avec cet anticorps (Denzel et coll., 2010) afin de neutraliser

l'adiponectine et ses effets. Afin de déterminer les effets directs du CP-3(iv) sur le cœur, ainsi que la contribution de l'adiponectine cardiaque sur les effets cardioprotecteurs du CP-3(iv), nous avons utilisé un anticorps neutralisant de l'adiponectine de manière concomitante avec le CP-3(iv) pour les comparer avec le groupe CP-3(iv) + IgG. De plus, puisque l'administration d'une dose unique est possible *in vivo*, nous avons ajouté le traitement au perfusat seulement au moment de la reperfusion. Nos résultats montrent que l'ajout du CP-3(iv) améliore la récupération fonctionnelle du VG qui est mesurée à l'aide du paramètre du produit entre le rythme cardiaque et la pression développée (RPP, *rate pressure product*). Il est à noter que la RPP élevée n'est pas dû à une augmentation du rythme cardiaque, ce qui serait néfaste pour le cœur dans une situation d'IAM, mais plutôt d'une augmentation de la pression développée. La forte tendance à une augmentation du  $dP/dt_{max}$ , un indice de contractilité ventriculaire, et de la tendance à un  $dP/dt_{min}$  plus faible, un indice de la relaxation ventriculaire, seraient responsables du grand écart entre la pression systolique et la pression diastolique, respectivement. L'addition de l'anti-adiponectine avec le CP-3(iv) a renversé les effets cardioprotecteurs du CP-3(iv), telle qu'observée par une diminution de la récupération fonctionnelle du VG à un niveau similaire aux cœurs traités avec le véhicule (NaCl 0,9%). La tendance à une quantité plus élevée d'adiponectine dans les cœurs traités avec le CP-3(iv) et une plus faible quantité d'adiponectine HMW dans le perfusat nous indique qu'il y a plus de molécules d'adiponectine liées à ses récepteurs et moins qui soient perdues dans la solution de perfusion. À l'opposé, le traitement avec le véhicule ne stimule pas la synthèse d'adiponectine et la quantité plus élevée de HMW dans le perfusat indiquerait une libération dans le milieu par nécrose. Il est à noter que le gras péricardial a été retiré avant l'expérience, mais que le gras épicaldial, qui est aussi une source de production et de sécrétion d'adiponectine (Antonopoulos et coll., 2016), ne peut pas être retiré, ce qui constitue une limite à notre expérience. Finalement, le débit coronaire plus élevé est une indication que le CP-3(iv) induit une vasodilatation des artères coronaires, permettant un apport plus important d'oxygène et de nutriments essentiels à la survie des cardiomyocytes. Ces effets au niveau du cœur sont dépendants du récepteur CD36, puisqu'on n'observe aucune différence entre les groupes chez les souris déficientes en CD36.



**Figure 46. Figure récapitulative de la première étude**

Les protéines sont encerclées, alors que les effets sont encadrés. AdipoR, *adiponectin receptor* ; AG, acide gras ; AGNE, acide gras non estérifié ; CD36, *cluster of differentiation-36* ; C/EBP, *CCAAT/enhancer-binding protein* ; COX-2, cyclooxygénase-2 ; CTE, chaîne de transport des électrons ; cyto c, cytochrome c ; FATP1, *fatty acid transporter protein 1* ; GLUT4, *glucose transporter type 4* ; NOX-2, sous-unité de la NADPH-oxydase ; NRF2, *E2-related factor 2* ; p-ACC, acétyl-CoA carboxylase phosphorylé ; p-Akt, protéine kinase B phosphorylée ; p-AMPK, protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate phosphorylée ; PCK1, *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1* ; PGE2, prostaglandine E2 ; PPAR $\gamma$ , *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  ; ROS, espèces réactives de l'oxygène ; RXR, récepteur X de rétinoïdes ; TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$* .

### **4.3 Effets cardioprotecteurs du fragment 6-13 de la ghréline désacylée dans l'I/RM**

Notre deuxième objectif était de montrer qu'un fragment peptidique de l'UAG, l'UAG<sub>6-13</sub> de forme linéaire, possède des effets cardioprotecteurs dans la pathologie de l'I/RM et d'identifier les mécanismes moléculaires. Nos travaux (section 3.4) montrent que le traitement avec l'UAG<sub>6-13</sub> diminue la taille de l'infarctus et la dysfonction cardiaque en réduisant l'inflammation, tels qu'observés par des taux circulants plus faibles d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ . Au niveau du myocarde, l'activation de l'apoptose est réduite, suite à une augmentation de l'activité de l'AMPK et une diminution de la relâche de cytochrome c et d'AIF mitochondriale dans le cytosol. Le modèle de cœur isolé en mode Langendorff nous a permis de montrer que les effets cardioprotecteurs de l'UAG<sub>6-13</sub> à la dose utilisée dans notre étude sont indépendants du récepteur de la ghréline à l'aide de l'antagoniste D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6.

L'étude de Baldanzi et coll. a clairement montré que l'UAG possède des effets cardioprotecteurs en inhibant l'apoptose induite par la doxorubicine sur les cardiomyocytes H9c2 en culture. Cet effet est aussi observé avec la ghréline et implique l'activation de la voie Akt et ERK1/2. Une observation intéressante est que les auteurs n'ont pas détecté la présence du gène et de la protéine du récepteur de la ghréline et qu'une étude de liaison a montré que la ghréline et l'UAG liaient un seul et même récepteur avec une forte affinité ( $K_D = 4,0$  nM et 4,8 nM, respectivement) sur les cardiomyocytes H9c2 (Baldanzi et coll., 2002). Chez les sujets humains, il a été montré que l'administration de la ghréline cause une augmentation de la glycémie et que l'UAG renverse cet effet (Broglia et coll., 2004; Gauna et coll., 2004), et qu'il existe une corrélation inverse entre les concentrations circulantes d'UAG et la résistance à l'insuline (Barazzoni et coll., 2007; St-Pierre et coll., 2007). Granata et coll. ont montré que la ghréline et l'UAG inhibent l'apoptose induite par le sevrage du sérum ou la présence d'IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  sur les cellules pancréatiques  $\beta$  de type HIT-T15, tel qu'observé chez les sujets affectés par le diabète de type I. Les cellules HIT-T15 n'expriment pas le récepteur de la ghréline et, de manière similaire aux cardiomyocytes H9c2, expriment un récepteur commun qui lie la ghréline et à l'UAG avec une très haute affinité (Granata et coll., 2007). Cette étude a conduit le groupe de Ghigo à tester l'effet de différents fragments de l'UAG sur la survie des cellules HIT-T15.

Les résultats ont montré que la séquence 6-13 de l'UAG possédait les meilleurs effets sur la survie des cellules HIT-T15 après un stress causé par le sevrage du sérum ou par la présence de cytokines pro-inflammatoires (Granata et coll., 2012). La modification additionnelle du fragment de l'UAG<sub>6-13</sub> les a amenés à produire une forme cyclique (AZP-531) qui présente une plus grande demi-vie (2-3 h) (Allas et coll., 2016) *in vivo* que l'UAG<sub>6-13</sub> de forme linéaire (16 min) (Julien et coll., 2012). L'AZP-531 a ensuite montré des effets bénéfiques pour prévenir le syndrome métabolique. En effet, l'AZP-531 renverse le développement de la résistance à l'insuline, de l'inflammation et de l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux à la suite d'une diète riche en lipides et ce, de manière plus efficace que l'UAG (Delhanty et coll., 2013). L'AZP-531 est présentement breveté et des essais cliniques de phase I sont en cours pour le traitement du diabète (Allas et coll., 2016) et de phase II pour le traitement du syndrome de Prader-Willi (Allas et coll., 2018). Pendant que notre deuxième papier était en préparation, une publication par Harisseh et coll. a montré des effets cardioprotecteurs de l'AZP-531 dans la pathologie de l'I/RM (Harisseh et coll., 2017). Dans cette étude, les souris ont été soumises à une ligature de la LAD pendant 45 min et l'AZP-531 ou l'UAG (1 mg/kg) est administrée 5 min avant la reperfusion et 30 min après la reperfusion. La taille de l'infarctus déterminée par le ratio de RI/RAR est réduite de 29% chez les souris traitées avec l'UAG et de 42% avec l'AZP-531. La diminution des dommages à la reperfusion serait liée à une augmentation de la phosphorylation d'Akt, d'ERK1/2, et de deux substrats de mTORC1, soit 4EBP1 et S6 qui sont impliqués dans l'apoptose, l'autophagie et la synthèse des protéines. Ces voies ont entraîné une diminution de la forme active de la caspase-3 et de la translocation de Bax à la mitochondrie, prévenant ainsi l'apoptose. À 15 min de reperfusion, l'expression protéique de la catalase est augmentée, et à 24 h de reperfusion, celle de la catalase et du SOD sont augmentées, montrant un effet anti-oxydant de l'AZP-531. De manière intéressante, l'AZP-531 n'a pas d'effet sur l'ouverture du PTPm, telle que mesurée par la capacité de rétention du calcium (Harisseh et coll., 2017).

Pour notre deuxième étude, nous avons investigué les effets cardioprotecteurs d'un fragment de l'UAG qui conserve son activité biologique. Ses effets cardioprotecteurs et de sensibilisation à l'insuline, déjà démontrés, ont fait qu'il serait intéressant de déterminer si l'UAG et le fragment UAG<sub>6-13</sub> peuvent améliorer le métabolisme énergétique cardiaque en

favorisant l'utilisation du glucose dans la pathologie de l'I/RM (Lopaschuk et coll., 2010). Nous avons choisi d'utiliser la forme linéaire de l'UAG<sub>6-13</sub> qui est commercialement disponible. De plus, l'utilisation d'un fragment de la protéine plutôt que la protéine naturelle pourrait plus facilement permettre la synthèse de nouveaux peptides pour améliorer l'activité du ligand (Di, 2015). En général, la protéine naturelle possède une courte demi-vie (32-39 min pour l'UAG) (Tong et coll., 2013) et la modification de son fragment, qui retient tout de même son activité biologique, a pour but de l'augmenter (2-3 h pour l'AZP-531) (Allas et coll., 2016). Dans plusieurs études, la méthode d'injection de l'UAG se fait perfusion continue à l'aide de pompes osmotiques (Delhanty et coll., 2013; Heppner et coll., 2014; Martini et coll., 2006; Ozcan et coll., 2017). Toutefois, pour diminuer les chances d'une désensibilisation du récepteur, nous avons opté pour une injection biquotidienne comme dans certaines publications (Gortan Cappellari et coll., 2016; Martini et coll., 2006; Porporato et coll., 2013).

Nos résultats montrent qu'un prétraitement biquotidien de 14 jours avec l'UAG (0,1 µmol/kg) réduit le ratio de la taille de l'infarctus sur la RAR de 43%, ce qui est 14% de plus comparativement aux résultats de Harisseh et coll. qui ont traité les souris avec l'UAG 5 min avant et 30 min après la reperfusion, à une dose de 1 mg/kg, soit l'équivalent de 31 µmol/kg (Harisseh et coll., 2017). Avec l'UAG<sub>6-13</sub>, nos résultats montrent une réduction de la taille de l'infarctus de 34% à une dose de 1 µmol/kg, soit 8% de moins que pour l'AZP-531 (42%) à une dose de 1 mg/kg, soit l'équivalent de 1 µmol/kg, dans l'étude de Harisseh et coll. Toutefois, notre dose à 3 µmol/kg avec l'UAG<sub>6-13</sub> a réduit la taille d'infarctus de 54%, soit 8% de plus que pour l'AZP-531 à une dose de 1 µmol/kg. Notre étude montre que le prétraitement avec l'UAG amorce son récepteur et protège plus le myocarde contre les dommages de la reperfusion, et que l'AZP-531 présente des effets cardioprotecteurs très puissants, puisque son administration seulement après l'occurrence de la ligature de la LAD réduit plus la taille de l'infarctus en comparaison à une concentration équivalente de l'UAG<sub>6-13</sub> administrée en prétraitement. La demi-vie de l'AP-531 qui est approximativement cinq fois plus longue que celle de l'UAG<sub>6-13</sub> linéaire pourrait expliquer en partie son effet cardioprotecteur plus puissant. Il serait intéressant dans une prochaine étude d'investiguer les effets d'un traitement avec l'UAG<sub>6-13</sub> après l'induction d'une l'ischémie du myocarde comme dans le papier de Harisseh et coll. Nous avons décidé d'investiguer les voies de signalisation et la fonction cardiaque dans un temps précoce,

soit à 6 h de reperfusion, avec la dose de 3000 nmol/kg pour l'UAG<sub>6-13</sub>, puisqu'elle présente un effet cardioprotecteur plus proche de celui de l'UAG à 100 nmol/kg.

La diminution de la taille de l'infarctus chez les souris prétraitées avec l'UAG et de manière plus marquante chez les souris prétraitées avec l'UAG<sub>6-13</sub> (3 µmol/kg) montre une préservation de leur fonction cardiaque à 6 h de reperfusion. Le groupe traité avec l'UAG<sub>6-13</sub> montre un volume d'éjection et un débit cardiaque (un indice de la performance cardiaque) significativement plus élevés sans modification du rythme cardiaque, alors que le volume d'éjection et le débit cardiaque ont tendance à être plus élevés dans le groupe traité avec l'UAG, en comparaison au groupe témoin traité avec le véhicule. On observe aussi une amélioration des paramètres systoliques, tels que la fraction d'éjection, le  $dP/dt_{max}$  (un indice de contractilité dépendante de la charge), le travail systolique (la force appliquée par le ventricule contre le volume de sang pour l'éjecter), le PRSW (un indice de contractilité indépendante de la charge) et le ratio Ea/Ees (le couplage artériel-ventriculaire, représenté par le ratio entre la post-charge artérielle et la contractilité ventriculaire indépendante de la charge) pour les groupes traités avec l'UAG<sub>6-13</sub> et l'UAG. Finalement, les paramètres diastoliques, représentés par une baisse de  $dP/dt_{min}$  et de Tau (des indices de relaxation du VG pendant la diastole), sont aussi améliorés pour les groupes traités avec l'UAG<sub>6-13</sub> et l'UAG. Le traitement avec l'UAG et l'UAG<sub>6-13</sub> comporte donc des effets inotropes et lusitropes bénéfiques pour le myocarde qui sont reflétés par une diminution de la taille de l'infarctus.

Une étude a montré qu'il existe une corrélation négative entre la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$  à 48 h après un IAM avec élévation du segment ST et de la fraction d'éjection chez des patients humains (Gonzalvez et coll., 2007). Nous n'avons pas mesuré la fonction cardiaque à 48 h de reperfusion, mais nos résultats à 6 h de reperfusion suivent cette tendance, où les concentrations circulantes de TNF- $\alpha$  sont plus faibles. Une étude a montré que l'UAG diminue la sécrétion et l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  par les macrophages RAW264.7 stimulés avec le phorbol 12-myristate 13-acétate (Au et coll., 2017), alors qu'une autre étude a montré que l'administration biquotidienne de 200 µg d'UAG pendant quatre jours diminue l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  dans le muscle gastrocnémien de rats (Gortan Cappellari et coll., 2016). Dans une étude sur les cellules microgliales N9 n'exprimant pas le

récepteur de la ghréline, l'incubation avec l'UAG a diminué l'expression de l'IL-6 stimulé par les  $\beta$ -amyloïdes (Bulgarelli et coll., 2009). Ces études appuient les effets anti-inflammatoires de l'UAG et de l'UAG<sub>6-13</sub> observés dans nos résultats. Par ailleurs, les études de Ugwu et coll. et de Togliatto et coll. ont montré que l'UAG active la SIRT1 dans le modèle d'ischémie/reperfusion des membres inférieurs et conduit à l'augmentation de l'expression protéique de SOD2 (Ugwu et coll., 2017) et à une diminution de l'expression protéique de Bax et d'AIF et de la phosphorylation de NF $\kappa$ B (Togliatto et coll., 2015). La SIRT1 peut être activée par l'AMPK qui augmente la production de NAD<sup>+</sup> (Canto et coll., 2009), alors que l'AMPK peut être activé par la SIRT1 qui désacétyle le résidu Lys48 de LKB1, causant sa translocation du noyau vers le cytoplasme et la phosphorylation de l'AMPK (Suchankova et coll., 2009). L'activation de l'AMPK par l'UAG<sub>6-13</sub> et du SOD2 par l'AZP-531 pourrait faire de la SIRT1 un point commun entre nos deux études. La production de ROS est l'un des principaux facteurs qui conduit à l'apoptose (Zhou et coll., 2018). L'activation de la catalase et du SOD2 par l'AZP-531 montre que son mécanisme anti-apoptotique est lié à une diminution du stress oxydatif. Dans notre étude, l'UAG<sub>6-13</sub> diminue l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$ , connu pour activer la voie NF $\kappa$ B (Whelan et coll., 2010). De plus, nos résultats montrent que le traitement avec l'UAG<sub>6-13</sub> présente des mécanismes anti-apoptotiques additionnels, en diminuant la relâche de cytochrome c et d'AIF mitochondriale dans le cytosol, possiblement par l'activation de l'AMPK. La présence de cytochrome c cytosolique mène à la formation de l'apoptosome et de l'apoptose en activant les caspases (Dorweiler et coll., 2007), tandis que l'AIF peut transloquer dans le noyau et provoquer la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN (Susin et coll., 1999). L'activation d'AMPK affecte aussi plusieurs autres voies de signalisation qui sont bénéfiques lors de la reperfusion d'une IAM que nous n'avons pas encore investiguées, telles que l'inhibition de la synthèse de protéines permettant de conserver l'ATP, ainsi que la promotion de l'autophagie permettant de remplacer les organelles non-fonctionnelles (Qi et Young, 2015).

L'AMPK est aussi reconnue pour son effet sur le métabolisme. En effet, l'activation de l'AMPK induit la translocation du transporteur du glucose (GLUT4) vers le sarcolemme, favorisant l'entrée et l'oxydation du glucose dans la cellule (Russell et coll., 2004). L'AMPK phosphoryle et inactive aussi l'ACC, promouvant aussi l'oxydation des acides gras et la

production additionnelle d'ATP (Bairwa et coll., 2016). L'anticorps que nous avons utilisé reconnaît à la fois l'ACC1 et l'ACC2 présents dans le cytosol et sur les mitochondries, respectivement. L'ACC1 est responsable de la synthèse des acides gras et de leur stockage sous forme de TG en synthétisant le malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA qui sera utilisé par l'enzyme acyl-CoA synthétase (Wakil et Abu-Elheiga, 2009). L'ACC2 est responsable de produire le malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA qui lie et inhibe la CPT1b, inhibant ainsi l'entrée et l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie (Saddik et coll., 1993). La phosphorylation de l'ACC2 et de l'ACC1 par l'AMPK inhibe leur activité, ce qui favorise l'oxydation des acides gras et diminue la synthèse et le stockage des TG, respectivement. Une accumulation d'acides gras intracellulaire augmente le réservoir des TG et conduit à la production de céramides qui inhibe la phosphorylation et l'activation d'IRS1. Les cardiomyocytes répondraient moins bien à l'insuline et il y aura moins de translocation du GLUT4 à la surface membranaire et par conséquent, moins d'entrée et d'oxydation du glucose (Glatz et Luiken, 2018). L'augmentation de l'activité de l'AMPK et la diminution de l'activité de l'ACC par l'UAG et l'UAG<sub>6-13</sub> dans notre étude amélioreraient donc la sensibilité des cardiomyocytes à l'insuline. La phosphorylation de l'Akt peut aussi induire la translocation du GLUT4 au sarcolemme. Dans notre étude, seul l'UAG a induit une tendance de la phosphorylation de l'Akt à 6 h de reperfusion. Dans l'étude de Harisseh et coll., l'augmentation de la phosphorylation de l'Akt a été observée à 15 min de reperfusion (Harisseh et coll., 2017). Il serait possible que les voies qui mènent à l'activation de l'Akt aient lieu à un moment plus précoce de la reperfusion et qu'elles soient plus transitoires par la stimulation de l'UAG et ses analogues.

Une limitation des études qui portent sur l'UAG et ses analogues, ce qui inclus la nôtre et celles sur l'AZP-531, est que le récepteur de l'UAG n'est pas encore connu. Les études jusqu'à ce jour permettent de dire qu'il existe 1) le récepteur de la ghréline 2) au moins un récepteur GRLR (*ghrelin receptor-like-receptor*) qui peut lier la ghréline et l'UAG avec une affinité similaire 3) au moins un récepteur de l'UAG qui ne lie pas la ghréline mais qui peut lier l'UAG avec une forte affinité (Callaghan et Furness, 2014). La ghréline possède plusieurs effets cardioprotecteurs similaires à l'UAG. Une étude a montré que la ghréline réduit l'infarctus du myocarde, la concentration de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 en circulation, l'activité de la caspase-3 et de la

caspase-9 et augmente l'activité du SOD et du GSH-Px dans un modèle d'I/RM (Sun et coll., 2016). De plus, la ghréline a protégé le myocarde contre les dommages induits par la technique de circulation extra-corporelle dérivant la circulation sanguine dans le cœur et les poumons en dehors du corps, en diminuant le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, l'apoptose, la dysfonction cardiaque et en augmentant la phosphorylation de l'Akt de manière dépendante du récepteur de la ghréline (Cao et coll., 2013). Dans le but de déterminer si les effets cardioprotecteurs sont dépendants du récepteur de la ghréline, nous avons utilisé le modèle de cœur isolé en mode Langendorff. Ce modèle nous a permis de comparer les effets sur la récupération de la fonction cardiaque après 1) l'administration de la ghréline, en comparaison avec 2) l'administration concomitante de la ghréline et de la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 (un antagoniste sélectif du récepteur de la ghréline), 3) l'administration de l'UAG et 4) l'administration concomitante de l'UAG et de la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6. Le modèle de cœur isolé nous a aussi permis d'évaluer les effets cardioprotecteurs de l'UAG<sub>6-13</sub> directement au niveau cardiaque. Nos résultats de Langendorff ont montré une forte baisse de la récupération de la fonction cardiaque dans le groupe traité avec la ghréline + D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 en comparaison avec les trois autres groupes qui ont montré des effets très similaires de la récupération de la fonction cardiaque mesurée par le RPP. Nos résultats appuient que les effets cardioprotecteurs de l'UAG<sub>6-13</sub> sont indépendants du récepteur de la ghréline. Toutefois, l'étude de Kim et coll. a montré que les effets prolifératifs de la ghréline ont été inhibés par la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 sur les cellules MC3T3-E1 d'ostéoblastes de rats qui n'expriment pas le récepteur de la ghréline (Kim et coll., 2005). Ce résultat suggère que la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 pourrait potentiellement aussi lier les GRLR. Dans le cas où la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 lie le GRLR, cela augmente les probabilités que l'UAG<sub>6-13</sub> ne lie que le récepteur de l'UAG, sinon son administration concomitante avec la D-Lys<sup>3</sup>-GHRP-6 diminuerait le RPP. L'étude de Lear et coll. a montré qu'une culture primaire de cardiomyocytes de souris possède deux sites de liaisons spécifiques pour l'UAG qui ne lient pas la ghréline (Lear et coll., 2010). Des études plus approfondies sont nécessaires pour déterminer la contribution relative des récepteurs de l'UAG dans les effets cardioprotecteurs de l'UAG et de ses analogues.

## **Chapitre 5 : PERSPECTIVES ET CONCLUSION**

## 5.1 Perspectives

### 5.1.1 Nouveaux peptides cardioprotecteurs

Nous avons choisi les peptides présents dans nos études en nous basant sur des études antérieures de structure-activité et d'effets biologiques *in vitro* d'une banque d'analogues du GHRP-6 et dérivés azapeptide. Dans le cas de l'azapeptide CP-3(iv), sa sélectivité envers le CD36 permettait de répondre à l'un de nos objectifs principaux qui est d'identifier le rôle du CD36 dans la cardioprotection de l'I/RM. Le deuxième critère a été déterminé par son effet pro-angiogénique sur les microvaisseaux de choroïdes en culture (Proulx et coll., 2012). En ce qui concerne l'UAG, les travaux publiés de Granata et coll. sont les seuls qui portent sur le développement des fragments de l'UAG et de ses analogues à ce jour. Le fragment UAG<sub>6-13</sub> a été choisi pour ses effets de pro-survie, anti-apoptotique et anti-oxydatif sur des cellules  $\beta$  pancréatiques en culture (Granata et coll., 2012). Toutefois, l'un des mécanismes que nous désirions investiguer était l'induction d'un changement métabolique favorable vers l'oxydation du glucose en début de reperfusion suite à un IAM (Lopaschuk et coll., 2010). Il serait donc préférable que le critère de choix pour les prochains peptides à étudier soit basé sur des résultats de métabolisme. L'étude de Guo et coll. a montré qu'il est possible d'utiliser la technologie *Agilent Seahorse Technology* pour cribler plusieurs composés pour leurs effets sur l'oxydation du glucose sur des cardiomyocytes en culture (Guo et coll., 2012). De plus, leur étude montre qu'il est possible d'induire une ischémie en abaissant les pistons de la machine *Seahorse*, qui servent à mesurer la relâche d'acide extracellulaire, pour une durée de 60 min et une reperfusion en levant les pistons. Par la suite, la mort cellulaire peut être quantifiée, et il serait possible de mettre au point une technique rapide pour mesurer la production de ROS.

### 5.1.2 Administration du traitement avec un peptide cardioprotecteur

Dans les travaux présentés dans cette thèse, nous avons administré les traitements de manière préventive avant la ligature de l'artère coronaire descendante gauche. Dans l'éventualité où les peptides dérivés des sécrétagogues de l'HC soient utilisés pour traiter la progression de l'athérosclérose qui précède souvent un IAM, l'administration ne pourrait être

administrée que de façon aiguë avant et/ou après la reperfusion. Dans notre première étude, nous avons montré qu'une dose équimolaire à celle donnée en prétraitement (300 nmol/kg) n'était pas suffisante pour réduire la taille de l'infarctus lorsqu'administrée 10 min avant la reperfusion et 24 h plus tard, et qu'il fallait augmenter la dose de trois fois afin de diminuer la taille de l'infarctus de manière significative (44%). Dans notre deuxième étude, une étude préliminaire a montré qu'une dose de 200 nmol/kg d'UAG 10 min avant la reperfusion et 24 h plus tard n'était pas suffisante pour réduire la taille de l'infarctus. Nous n'avons pas fait une étude de dose unique avec l'UAG<sub>6-13</sub>, mais l'étude de Harisseh et coll. montre qu'un traitement avec l'UAG (31 µmol/kg) et l'AZP-531 (1 µmol/kg) administrés 5 min avant et 30 min après la reperfusion diminue la taille de l'infarctus de 29% et 42%, respectivement, à 24 h de reperfusion (Harisseh et coll., 2017). Comparativement à l'étude de Harisseh et coll., nous n'avons pas investigué les mécanismes à l'échelle moléculaire qui découlent de l'effet cardioprotecteur d'un traitement avec l'UAG<sub>6-13</sub> seulement à 10 min avant la reperfusion. Il faudrait commencer par mesurer les effets observés avec un prétraitement, tels que la fonction cardiaque, la lipolyse dans le tissu adipeux, et le métabolisme, le stress oxydatif et l'apoptose au niveau du myocarde. Il faudrait aussi déterminer si l'adiponectine joue un rôle sur les effets de l'UAG<sub>6-13</sub> (Huynh et coll., 2018).

### **5.1.3 Effets des peptides dérivés des sécrétagogues de l'hormone de croissance dans le développement de l'insuffisance cardiaque**

Dans la dernière décennie, les améliorations dans le traitement de l'IAM ont permis de diminuer de 5,3% à 3,8% le taux de mortalité dans les hôpitaux liés à la maladie cardiaque ischémique (Rahimi et coll., 2015). Il s'ensuit alors que le nombre de personnes âgées augmente la prévalence de la maladie ischémique et du développement potentiel de l'insuffisance cardiaque qui s'en suit (Benjamin et coll., 2017). Les traitements actuels pour l'insuffisance cardiaque sont principalement les mêmes que ceux utilisés de routine suite à une I/RM, tels que les bêta-bloqueurs, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (sartans) et les antagonistes de l'aldostérone, et ils manquent d'efficacité. Il serait donc d'intérêt d'évaluer les effets des ligands du CD36 et des analogues de l'UAG à réduire la progression de l'insuffisance cardiaque suivant l'I/RM.

L'insuffisance cardiaque est caractérisée par une fibrose et un remodelage cardiaque qui peuvent affecter négativement la fonction contractile du myocarde (Talman et Ruskoaho, 2016). Suite à une ligature de la LAD, l'insuffisance cardiaque peut se développer après quelques jours et progresser pendant quelques semaines (Yang et coll., 2002). Il est possible d'accélérer sa progression avec le modèle de ligature permanente de la LAD (Muthuramu et coll., 2014) et par l'induction avec la doxorubicine (Mitry et Edwards, 2016). En effet, des études ont déjà montré les effets cardioprotecteurs de l'UAG sur les cardiomyocytes H9c2 (Baldanzi et coll., 2002) et les souris (Pei et coll., 2014) traitées avec la doxorubicine et l'atténuation de l'accumulation de collagène dans le modèle de cardiomyopathie diabétique (Pei et coll., 2015). De plus, des études ont montré que l'adiponectine diminue la fibrose et le remodelage cardiaque induits par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans un modèle *in vivo* (Essick et coll., 2011) et dans un modèle de surcharge de pression par une constriction transaortique (Shibata et coll., 2004), supportant le CP-3(iv) dans le traitement de l'insuffisance cardiaque. Les études avec l'hexaréline ont aussi montré une réduction de la fibrose dans un modèle murin d'I/RM (McDonald et coll., 2018), chez le rat hypertendu spontanément (Xu et coll., 2012) ou soumis à une surcharge de pression de l'aorte abdominale (Xu et coll., 2005), renforçant le fait de cibler le récepteur CD36 dans la pathologie de l'insuffisance cardiaque.

## 5.2 Conclusion

Les travaux dans cette thèse ont permis de mettre en évidence les effets cardioprotecteurs de deux classes de peptides différentes dérivées des sécrétagogues de l'hormone de croissance dans la maladie cardiaque ischémique. La première classe comporte un dérivé du GHRP-6, l'azapeptide [His<sup>1</sup>, AzaPhe<sup>4</sup>]-GHRP-6, qui lie le récepteur CD36. La deuxième classe comporte un fragment peptidique de l'UAG, l'UAG<sub>6-13</sub>, dont le récepteur reste encore inconnu. Les deux peptides présentent une cardioprotection contre les dommages liés à l'I/RM telles que démontré par une diminution de la taille de l'infarctus, une réduction de la dysfonction cardiaque et une inhibition de l'apoptose. Le CP-3(iv) se distingue par des effets additionnels comme une réduction du stress oxydatif et par le fait que ses effets sont médiés en partie par l'adiponectine, alors que l'UAG<sub>6-13</sub> présente plutôt des effets anti-inflammatoires. La combinaison de ces mécanismes qui conduit à la cardioprotection fait des peptides dérivés des sécrétagogues de l'hormone de croissance une nouvelle approche thérapeutique potentielle dans le traitement de la pathologie de l'ischémie/reperfusion du myocarde.

## Bibliographie

- Abbott, B. D. (2009). Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol*, 27(3-4), 246-257. doi: 10.1016/j.reprotox.2008.10.001
- Abdurrachim, D., Luiken, J. J., Nicolay, K., Glatz, J. F., Prompers, J. J. et Nabben, M. (2015). Good and bad consequences of altered fatty acid metabolism in heart failure: evidence from mouse models. *Cardiovasc Res*, 106(2), 194-205. doi: 10.1093/cvr/cvv105
- Abumrad, N. A., el-Maghrabi, M. R., Amri, E. Z., Lopez, E. et Grimaldi, P. A. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*, 268(24), 17665-17668.
- Abumrad, N. A. et Goldberg, I. J. (2016). CD36 actions in the heart: Lipids, calcium, inflammation, repair and more? *Biochim Biophys Acta*, 1861(10), 1442-1449. doi: 10.1016/j.bbailip.2016.03.015
- Abumrad, N. A. et Moore, D. J. (2011). Parkin reinvents itself to regulate fatty acid metabolism by tagging CD36. *J Clin Invest*, 121(9), 3389-3392. doi: 10.1172/JCI59219
- Adamcova, M., Popelova-Lencova, O., Jirkovsky, E., Simko, F., Gersl, V. et Sterba, M. (2016). Cardiac troponins--Translational biomarkers in cardiology: Theory and practice of cardiac troponin high-sensitivity assays. *Biofactors*, 42(2), 133-148. doi: 10.1002/biof.1261
- Adams, J. C. et Lawler, J. (2004). The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(6), 961-968. doi: 10.1016/j.biocel.2004.01.004
- Adamson, S. et Leitinger, N. (2011). Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. *Curr Opin Lipidol*, 22(5), 335-342. doi: 10.1097/MOL.0b013e32834a97e4
- Agrawal, V., Gupta, J. K., Qureshi, S. S. et Vishwakarma, V. K. (2016). Role of cardiac renin angiotensin system in ischemia reperfusion injury and preconditioning of heart. *Indian Heart J*, 68(6), 856-861. doi: 10.1016/j.ihj.2016.06.010
- Ahmadian, M., Duncan, R. E., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E. et Sul, H. S. (2007). Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol*, 2(2), 229-237. doi: 10.2217/17460875.2.2.229
- Aikawa, R., Nawano, M., Gu, Y., Katagiri, H., Asano, T., Zhu, W., Nagai, R. et Komuro, I. (2000). Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation*, 102(23), 2873-2879.
- Akamizu, T., Takaya, K., Irako, T., Hosoda, H., Teramukai, S., Matsuyama, A., Tada, H., Miura, K., Shimizu, A., Fukushima, M., Yokode, M., Tanaka, K. et Kangawa, K. (2004). Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol*, 150(4), 447-455.
- Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L. et Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 188(7), 1359-1368.
- Alexander, M. R., Moehle, C. W., Johnson, J. L., Yang, Z., Lee, J. K., Jackson, C. L. et Owens, G. K. (2012). Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque

- instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*, 122(1), 70-79. doi: 10.1172/JCI43713
- Alexander, M. R. et Owens, G. K. (2012). Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol*, 74, 13-40. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142315
- Alique, M., Luna, C., Carracedo, J. et Ramirez, R. (2015). LDL biochemical modifications: a link between atherosclerosis and aging. *Food Nutr Res*, 59, 29240. doi: 10.3402/fnr.v59.29240
- Allas, S., Caixas, A., Poitou, C., Coupaye, M., Thuilleaux, D., Lorenzini, F., Diene, G., Crino, A., Illouz, F., Grugni, G., Potvin, D., Bocchini, S., Delale, T., Abribat, T. et Tauber, M. (2018). AZP-531, an unacylated ghrelin analog, improves food-related behavior in patients with Prader-Willi syndrome: A randomized placebo-controlled trial. *PLoS One*, 13(1), e0190849. doi: 10.1371/journal.pone.0190849
- Allas, S., Delale, T., Ngo, N., Julien, M., Sahakian, P., Ritter, J., Abribat, T. et van der Lely, A. J. (2016). Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZP-531, a first-in-class analogue of unacylated ghrelin, in healthy and overweight/obese subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*, 18(9), 868-874. doi: 10.1111/dom.12675
- Allred, C. C., Krennmayr, T., Koutsari, C., Zhou, L., Ali, A. H. et Jensen, M. D. (2011). A novel ELISA for measuring CD36 protein in human adipose tissue. *J Lipid Res*, 52(2), 408-415. doi: 10.1194/jlr.M008995
- Altamirano, F., Wang, Z. V. et Hill, J. A. (2015). Cardioprotection in ischaemia-reperfusion injury: novel mechanisms and clinical translation. *J Physiol*, 593(17), 3773-3788. doi: 10.1113/JP270953
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Jr., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N. et Graziano, M. P. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303(5661), 1201-1204. doi: 10.1126/science.1093131
- Ambrose, J. A. et Singh, M. (2015). Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. *F1000Prime Rep*, 7, 08. doi: 10.12703/P7-08
- Amin, R. H., Mathews, S. T., Alli, A. et Leff, T. (2010). Endogenously produced adiponectin protects cardiomyocytes from hypertrophy by a PPARgamma-dependent autocrine mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299(3), H690-698. doi: 10.1152/ajpheart.01032.2009
- Amin, R. H., Mathews, S. T., Camp, H. S., Ding, L. et Leff, T. (2010). Selective activation of PPARgamma in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(1), E28-37. doi: 10.1152/ajpendo.00446.2009
- An, W., Li, Y., Xu, G., Zhao, J., Xiang, X., Ding, L., Li, J., Guan, Y., Wang, X., Tang, C., Li, X., Mulholland, M. et Zhang, W. (2010). Modulation of ghrelin O-acyltransferase expression in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem*, 26(4-5), 707-716. doi: 10.1159/000322338
- Anant, S. et Davidson, N. O. (2002). Identification and regulation of protein components of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme. A complex event. *Trends Cardiovasc Med*, 12(7), 311-317.

- Andersen, M., Lenhard, B., Whatling, C., Eriksson, P. et Odeberg, J. (2006). Alternative promoter usage of the membrane glycoprotein CD36. *BMC Mol Biol*, 7, 8. doi: 10.1186/1471-2199-7-8
- Antonopoulos, A. S., Margaritis, M., Verheule, S., Recalde, A., Sanna, F., Herdman, L., Psarros, C., Nasrallah, H., Coutinho, P., Akoumianakis, I., Brewer, A. C., Sayeed, R., Krasopoulos, G., Petrou, M., Tarun, A., Tousoulis, D., Shah, A. M., Casadei, B., Channon, K. M. et Antoniadis, C. (2016). Mutual Regulation of Epicardial Adipose Tissue and Myocardial Redox State by PPAR-gamma/Adiponectin Signalling. *Circ Res*, 118(5), 842-855. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307856
- Arango Duque, G. et Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, 5, 491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491
- Areschoug, T. et Gordon, S. (2009). Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cell Microbiol*, 11(8), 1160-1169. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01326.x
- Armesilla, A. L. et Vega, M. A. (1994). Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem*, 269(29), 18985-18991.
- Arslan, F., Smeets, M. B., O'Neill, L. A., Keogh, B., McGuirk, P., Timmers, L., Tersteeg, C., Hoefler, I. E., Doevendans, P. A., Pasterkamp, G. et de Kleijn, D. P. (2010). Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation*, 121(1), 80-90. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.880187
- Ascah, A., Khairallah, M., Daussin, F., Bourcier-Lucas, C., Godin, R., Allen, B. G., Petrof, B. J., Des Rosiers, C. et Burrelle, Y. (2011). Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300(1), H144-153. doi: 10.1152/ajpheart.00522.2010
- Asch, A. S., Barnwell, J., Silverstein, R. L. et Nachman, R. L. (1987). Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest*, 79(4), 1054-1061. doi: 10.1172/JCI112918
- Asch, A. S., Liu, I., Briccetti, F. M., Barnwell, J. W., Kwakye-Berko, F., Dokun, A., Goldberger, J. et Pernambuco, M. (1993). Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain. *Science*, 262(5138), 1436-1440.
- Aso, Y., Yamamoto, R., Wakabayashi, S., Uchida, T., Takayanagi, K., Takebayashi, K., Okuno, T., Inoue, T., Node, K., Tobe, T., Inukai, T. et Nakano, Y. (2006). Comparison of serum high-molecular weight (HMW) adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetic patients with coronary artery disease using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin. *Diabetes*, 55(7), 1954-1960. doi: 10.2337/db05-1525
- Au, C. C., Docanto, M. M., Zahid, H., Raffaelli, F. M., Ferrero, R. L., Furness, J. B. et Brown, K. A. (2017). Des-acyl ghrelin inhibits the capacity of macrophages to stimulate the expression of aromatase in breast adipose stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 170, 49-53. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.07.005
- Au, C. C., Furness, J. B. et Brown, K. A. (2016). Ghrelin and Breast Cancer: Emerging Roles in Obesity, Estrogen Regulation, and Cancer. *Front Oncol*, 6, 265. doi: 10.3389/fonc.2016.00265

- Avallone, R., Demers, A., Rodrigue-Way, A., Bujold, K., Harb, D., Anghel, S., Wahli, W., Marleau, S., Ong, H. et Tremblay, A. (2006). A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Mol Endocrinol*, 20(12), 3165-3178. doi: 10.1210/me.2006-0146
- Aviram, M., Rosenblat, M., Etzioni, A. et Levy, R. (1996). Activation of NADPH oxidase required for macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Metabolism*, 45(9), 1069-1079.
- Baan, J., van der Velde, E. T., de Bruin, H. G., Smeenk, G. J., Koops, J., van Dijk, A. D., Temmerman, D., Senden, J. et Buis, B. (1984). Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation*, 70(5), 812-823.
- Baan, J., van der Velde, E. T. et Steendijk, P. (1992). Ventricular pressure-volume relations in vivo. *Eur Heart J*, 13 Suppl E, 2-6.
- Badger, T. M., Millard, W. J., McCormick, G. F., Bowers, C. Y. et Martin, J. B. (1984). The effects of growth hormone (GH)-releasing peptides on GH secretion in perfused pituitary cells of adult male rats. *Endocrinology*, 115(4), 1432-1438. doi: 10.1210/endo-115-4-1432
- Badimon, L., Padro, T. et Vilahur, G. (2012). Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 1(1), 60-74. doi: 10.1177/2048872612441582
- Baer, A. N., Costello, P. B. et Green, F. A. (1991). Stereospecificity of the hydroxyeicosatetraenoic and hydroxyoctadecadienoic acids produced by cultured bovine endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1085(1), 45-52.
- Bagai, A., Dangas, G. D., Stone, G. W. et Granger, C. B. (2014). Reperfusion strategies in acute coronary syndromes. *Circ Res*, 114(12), 1918-1928. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302744
- Baillie, A. G., Coburn, C. T. et Abumrad, N. A. (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol*, 153(1), 75-81.
- Bairwa, S. C., Parajuli, N. et Dyck, J. R. (2016). The role of AMPK in cardiomyocyte health and survival. *Biochim Biophys Acta*, 1862(12), 2199-2210. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.07.001
- Baldanzi, G., Filigheddu, N., Cutrupi, S., Catapano, F., Bonisconi, S., Fubini, A., Malan, D., Baj, G., Granata, R., Broglio, F., Papotti, M., Surico, N., Bussolino, F., Isgaard, J., Deghenghi, R., Sinigaglia, F., Prat, M., Muccioli, G., Ghigo, E. et Graziani, A. (2002). Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*, 159(6), 1029-1037. doi: 10.1083/jcb.200207165
- Banach, M., Aronow, W. S., Serban, M. C., Rysz, J., Voroneanu, L. et Covic, A. (2015). Lipids, blood pressure and kidney update 2015. *Lipids Health Dis*, 14, 167. doi: 10.1186/s12944-015-0169-0
- Baragli, A., Ghe, C., Arnoletti, E., Granata, R., Ghigo, E. et Muccioli, G. (2011). Acylated and unacylated ghrelin attenuate isoproterenol-induced lipolysis in isolated rat visceral adipocytes through activation of phosphoinositide 3-kinase gamma and

- phosphodiesterase 3B. *Biochim Biophys Acta*, 1811(6), 386-396. doi: 10.1016/j.bbali.2011.03.001
- Baranova, I. N., Vishnyakova, T. G., Bocharov, A. V., Kurlander, R., Chen, Z., Kimelman, M. L., Remaley, A. T., Csako, G., Thomas, F., Eggerman, T. L. et Patterson, A. P. (2005). Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 280(9), 8031-8040. doi: 10.1074/jbc.M405009200
- Barazzoni, R., Zanetti, M., Ferreira, C., Vinci, P., Pirulli, A., Mucci, M., Dore, F., Fonda, M., Ciocchi, B., Cattin, L. et Guarnieri, G. (2007). Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(10), 3935-3940. doi: 10.1210/jc.2006-2527
- Barazzoni, R., Zanetti, M., Nagliati, C., Cattin, M.R., Ferreira, C., Giuricin, M., Palmisano, S., Edalucci, E., Dore, F., Guarnieri, G. et de Manzini, N. (2013) Gastric bypass does not normalize obesity-related changes in ghrelin profile and leads to higher acylated ghrelin fraction. *Obesity*, 21(4), 718-22. doi: 10.1002/oby.20272
- Barnett, B. P., Hwang, Y., Taylor, M. S., Kirchner, H., Pfluger, P. T., Bernard, V., Lin, Y. Y., Bowers, E. M., Mukherjee, C., Song, W. J., Longo, P. A., Leahy, D. J., Hussain, M. A., Tschop, M. H., Boeke, J. D. et Cole, P. A. (2010). Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science*, 330(6011), 1689-1692. doi: 10.1126/science.1196154
- Barnwell, J. W., Ockenhouse, C. F. et Knowles, D. M., 2nd. (1985). Monoclonal antibody OKM5 inhibits the in vitro binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to monocytes, endothelial, and C32 melanoma cells. *J Immunol*, 135(5), 3494-3497.
- Baron, L., Gombault, A., Fanny, M., Villeret, B., Savigny, F., Guillou, N., Panek, C., Le Bert, M., Lagente, V., Rassendren, F., Riteau, N. et Couillin, I. (2015). The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis*, 6, e1629. doi: 10.1038/cddis.2014.576
- Barth, E., Albuszies, G., Baumgart, K., Matejovic, M., Wachter, U., Vogt, J., Radermacher, P. et Calzia, E. (2007). Glucose metabolism and catecholamines. *Crit Care Med*, 35(9 Suppl), S508-518. doi: 10.1097/01.CCM.0000278047.06965.20
- Bastie, C. C., Hajri, T., Drover, V. A., Grimaldi, P. A. et Abumrad, N. A. (2004). CD36 in myocytes channels fatty acids to a lipase-accessible triglyceride pool that is related to cell lipid and insulin responsiveness. *Diabetes*, 53(9), 2209-2216.
- Beaumont, N. J., Skinner, V. O., Tan, T. M., Ramesh, B. S., Byrne, D. J., MacColl, G. S., Keen, J. N., Bouloux, P. M., Mikhailidis, D. P., Bruckdorfer, K. R., Vanderpump, M. P. et Srai, K. S. (2003). Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem*, 278(11), 8877-8880. doi: 10.1074/jbc.C200575200
- Bechmann, L. P., Hannivoort, R. A., Gerken, G., Hotamisligil, G. S., Trauner, M. et Canbay, A. (2012). The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J Hepatol*, 56(4), 952-964. doi: 10.1016/j.jhep.2011.08.025
- Becker, C., Sevilla, L., Tomas, E., Palacin, M., Zorzano, A. et Fischer, Y. (2001). The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes. *Endocrinology*, 142(12), 5267-5276. doi: 10.1210/endo.142.12.8555
- Bedendi, I., Alloatti, G., Marcantoni, A., Malan, D., Catapano, F., Ghe, C., Deghenghi, R., Ghigo, E. et Muccioli, G. (2003). Cardiac effects of ghrelin and its endogenous

- derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol*, 476(1-2), 87-95.
- Bednarek, M. A., Feighner, S. D., Pong, S. S., McKee, K. K., Hreniuk, D. L., Silva, M. V., Warren, V. A., Howard, A. D., Van Der Ploeg, L. H. et Heck, J. V. (2000). Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem*, 43(23), 4370-4376.
- Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., de Ferranti, S. D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jimenez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., Lichtman, J. H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C. T., Mackey, R. H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Thiagarajan, R. R., Reeves, M. J., Ritchey, M., Rodriguez, C. J., Roth, G. A., Rosamond, W. D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C. W., Turner, M. B., Virani, S. S., Voeks, J. H., Willey, J. Z., Wilkins, J. T., Wu, J. H., Alger, H. M., Wong, S. S., Muntner, P., American Heart Association Statistics, C. et Stroke Statistics, S. (2017). Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 135(10), e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485
- Benso, A., Calvi, E., Gramaglia, E., Olivetti, I., Tomellini, M., Ghigo, E. et Broglio, F. (2013). Other than growth hormone neuroendocrine actions of ghrelin. *Endocr Dev*, 25, 59-68. doi: 10.1159/000346054
- Benso, A., St-Pierre, D. H., Prodam, F., Gramaglia, E., Granata, R., van der Lely, A. J., Ghigo, E. et Broglio, F. (2012). Metabolic effects of overnight continuous infusion of unacylated ghrelin in humans. *Eur J Endocrinol*, 166(5), 911-916. doi: 10.1530/EJE-11-0982
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198-205. doi: 10.1038/415198a
- Bessi, V. L., Labbe, S. M., Huynh, D. N., Menard, L., Jossart, C., Febbraio, M., Guerin, B., Bentourkia, M., Lecomte, R., Carpentier, A. C., Ong, H. et Marleau, S. (2012). EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice. *Cardiovasc Res*, 96(1), 99-108. doi: 10.1093/cvr/cvs225
- Bezaire, V., Bruce, C. R., Heigenhauser, G. J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Bonen, A. et Spriet, L. L. (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290(3), E509-515. doi: 10.1152/ajpendo.00312.2005
- Bir, S. C., Xiong, Y., Kevil, C. G. et Luo, J. (2012). Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovasc Res*, 95(1), 7-18. doi: 10.1093/cvr/cvs143
- Birge, R. B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., Barcinski, M., Brekken, R. A., Huang, X., Hutchins, J. T., Freimark, B., Empig, C., Mercer, J., Schroit, A. J., Schett, G. et Herrmann, M. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ*, 23(6), 962-978. doi: 10.1038/cdd.2016.11
- Bishop, N. C., Hayashida, H., Clark, M., Coombs, C., Miller, S. et Stensel, D. J. (2014). Effect of acute and regular exercise on growth hormone secretagogue receptor-1a expression

- in human lymphocytes, T cell subpopulation and monocytes. *Brain Behav Immun*, 39, 172-179. doi: 10.1016/j.bbi.2013.09.017
- Bisi, G., Podio, V., Valetto, M. R., Broglio, F., Bertuccio, G., Aimaretti, G., Pelosi, E., Del Rio, G., Muccioli, G., Ong, H., Boghen, M. F., Deghenghi, R. et Ghigo, E. (1999). Cardiac effects of hexarelin in hypopituitary adults. *Eur J Pharmacol*, 381(1), 31-38.
- Bisi, G., Podio, V., Valetto, M. R., Broglio, F., Bertuccio, G., Del Rio, G., Arvat, E., Boghen, M. F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ong, H. et Ghigo, E. (1999). Acute cardiovascular and hormonal effects of GH and hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide, in humans. *J Endocrinol Invest*, 22(4), 266-272. doi: 10.1007/BF03343555
- Black, J. B., Premont, R. T. et Daaka, Y. (2016). Feedback regulation of G protein-coupled receptor signaling by GRKs and arrestins. *Semin Cell Dev Biol*, 50, 95-104. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.12.015
- Bliksoen, M., Mariero, L. H., Ohm, I. K., Haugen, F., Yndestad, A., Solheim, S., Seljeflot, I., Ranheim, T., Andersen, G. O., Aukrust, P., Valen, G. et Vinge, L. E. (2012). Increased circulating mitochondrial DNA after myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 158(1), 132-134. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.04.047
- Bobik, A. (2006). Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(8), 1712-1720. doi: 10.1161/01.ATV.0000225287.20034.2c
- Bochkov, V. N., Oskolkova, O. V., Birukov, K. G., Levonen, A. L., Binder, C. J. et Stockl, J. (2010). Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid Redox Signal*, 12(8), 1009-1059. doi: 10.1089/ars.2009.2597
- Bodart, V., Bouchard, J. F., McNicoll, N., Escher, E., Carriere, P., Ghigo, E., Sejlitz, T., Sirois, M. G., Lamontagne, D. et Ong, H. (1999). Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res*, 85(9), 796-802.
- Bodart, V., Febbraio, M., Demers, A., McNicoll, N., Pohankova, P., Perreault, A., Sejlitz, T., Escher, E., Silverstein, R. L., Lamontagne, D. et Ong, H. (2002). CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, 90(8), 844-849.
- Boersma, E., Maas, A. C., Deckers, J. W. et Simoons, M. L. (1996). Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet*, 348(9030), 771-775. doi: 10.1016/S0140-6736(96)02514-7
- Bohl, S., Medway, D. J., Schulz-Menger, J., Schneider, J. E., Neubauer, S. et Lygate, C. A. (2009). Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(6), H2054-2058. doi: 10.1152/ajpheart.00836.2009
- Boisvert, W. A., Santiago, R., Curtiss, L. K. et Terkeltaub, R. A. (1998). A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, 101(2), 353-363. doi: 10.1172/JCI1195
- Bolduc, O. R., Lambert-Lanteigne, P., Colin, D. Y., Zhao, S. S., Proulx, C., Boeglin, D., Lubell, W. D., Pelletier, J. N., Fethiere, J., Ong, H. et Masson, J. F. (2011). Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst*, 136(15), 3142-3148. doi: 10.1039/c1an15235a
- Bolick, D. T., Skafien, M. D., Johnson, L. E., Kwon, S. C., Howatt, D., Daugherty, A., Ravichandran, K. S. et Hedrick, C. C. (2009). G2A deficiency in mice promotes

- macrophage activation and atherosclerosis. *Circ Res*, 104(3), 318-327. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.181131
- Bonaventura, A., Montecucco, F. et Dallegri, F. (2016). Cellular recruitment in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Clin Invest*, 46(6), 590-601. doi: 10.1111/eci.12633
- Bonen, A., Campbell, S. E., Benton, C. R., Chabowski, A., Coort, S. L., Han, X. X., Koonen, D. P., Glatz, J. F. et Luiken, J. J. (2004). Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36. *Proc Nutr Soc*, 63(2), 245-249. doi: 10.1079/PNS2004331
- Bonen, A., Chabowski, A., Luiken, J. J. et Glatz, J. F. (2007). Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)*, 22, 15-29. doi: 10.1152/physiologyonline.2007.22.1.15
- Bonen, A., Jain, S. S., Snook, L. A., Han, X. X., Yoshida, Y., Buddo, K. H., Lally, J. S., Pask, E. D., Paglialunga, S., Beaudoin, M. S., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Harasim, E., Wright, D. C., Chabowski, A. et Holloway, G. P. (2015). Extremely rapid increase in fatty acid transport and intramyocellular lipid accumulation but markedly delayed insulin resistance after high fat feeding in rats. *Diabetologia*, 58(10), 2381-2391. doi: 10.1007/s00125-015-3691-8
- Bonen, A., Luiken, J. J., Arumugam, Y., Glatz, J. F. et Tandon, N. N. (2000). Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem*, 275(19), 14501-14508.
- Bonen, A., Parolin, M. L., Steinberg, G. R., Calles-Escandon, J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Heigenhauser, G. J. et Dyck, D. J. (2004). Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J*, 18(10), 1144-1146. doi: 10.1096/fj.03-1065fje
- Bonen, A., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J. et Heigenhauser, G. J. (2006). The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)*, 30(6), 877-883. doi: 10.1038/sj.ijo.0803212
- Bononi, A., Agnoletto, C., De Marchi, E., Marchi, S., Patergnani, S., Bonora, M., Giorgi, C., Missiroli, S., Poletti, F., Rimessi, A. et Pinton, P. (2011). Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res*, 2011, 329098. doi: 10.4061/2011/329098
- Bopassa, J. C., Ferrera, R., Gateau-Roesch, O., Couture-Lepetit, E. et Ovize, M. (2006). PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc Res*, 69(1), 178-185. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.07.014
- Borst, O., Ochmann, C., Schonberger, T., Jacoby, C., Stellos, K., Seizer, P., Flogel, U., Lang, F. et Gawaz, M. (2011). Methods employed for induction and analysis of experimental myocardial infarction in mice. *Cell Physiol Biochem*, 28(1), 1-12. doi: 10.1159/000331708
- Bouzo-Lorenzo, M., Santo-Zas, I., Lodeiro, M., Nogueiras, R., Casanueva, F. F., Castro, M., Pazos, Y., Tobin, A. B., Butcher, A. J. et Camina, J. P. (2016). Distinct phosphorylation sites on the ghrelin receptor, GHSR1a, establish a code that determines the functions of ss-arrestins. *Sci Rep*, 6, 22495. doi: 10.1038/srep22495
- Bowers, C. Y. (2012). History to the discovery of ghrelin. *Methods Enzymol*, 514, 3-32. doi: 10.1016/B978-0-12-381272-8.00001-5

- Bowers, C. Y., Momany, F., Reynolds, G. A., Chang, D., Hong, A. et Chang, K. (1980). Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology*, *106*(3), 663-667. doi: 10.1210/endo-106-3-663
- Bowers, C. Y., Momany, F. A., Reynolds, G. A. et Hong, A. (1984). On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*, *114*(5), 1537-1545. doi: 10.1210/endo-114-5-1537
- Bowers, C. Y., Reynolds, G. A., Durham, D., Barrera, C. M., Pezzoli, S. S. et Thorner, M. O. (1990). Growth hormone (GH)-releasing peptide stimulates GH release in normal men and acts synergistically with GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, *70*(4), 975-982. doi: 10.1210/jcem-70-4-975
- Bowers, C. Y., Sartor, A. O., Reynolds, G. A. et Badger, T. M. (1991). On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, *128*(4), 2027-2035. doi: 10.1210/endo-128-4-2027
- Boyanovsky, B. B., Shridas, P., Simons, M., van der Westhuyzen, D. R. et Webb, N. R. (2009). Syndecan-4 mediates macrophage uptake of group V secretory phospholipase A2-modified LDL. *J Lipid Res*, *50*(4), 641-650. doi: 10.1194/jlr.M800450-JLR200
- Boyle, J. J., Weissberg, P. L. et Bennett, M. R. (2003). Tumor necrosis factor-alpha promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *23*(9), 1553-1558. doi: 10.1161/01.ATV.0000086961.44581.B7
- Brand, K., Mackman, N. et Curtiss, L. K. (1993). Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms. *J Clin Invest*, *91*(5), 2031-2039. doi: 10.1172/JCI116425
- Brand, M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*, *45*(7-8), 466-472. doi: 10.1016/j.exger.2010.01.003
- Brasaemle, D. L., Rubin, B., Harten, I. A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A. R. et Londos, C. (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*, *275*(49), 38486-38493. doi: 10.1074/jbc.M007322200
- Braunersreuther, V., Montecucco, F., Asrih, M., Pelli, G., Galan, K., Frias, M., Burger, F., Quindere, A. L., Montessuit, C., Krause, K. H., Mach, F. et Jaquet, V. (2013). Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, *64*, 99-107. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.09.007
- Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A. J., Deghenghi, R. et Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, *86*(10), 5083-5086. doi: 10.1210/jcem.86.10.8098
- Broglio, F., Gottero, C., Prodam, F., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., Abribat, T., Van Der Lely, A. J. et Ghigo, E. (2004). Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, *89*(6), 3062-3065. doi: 10.1210/jc.2003-031964
- Brown, M. S. et Goldstein, J. L. (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, *52*, 223-261. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.001255

- Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K. et Anderson, R. G. (1979). Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J Cell Biol*, 82(3), 597-613.
- Bujold, K., Mellal, K., Zoccal, K. F., Rhainds, D., Brissette, L., Febbraio, M., Marleau, S. et Ong, H. (2013). EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 229(2), 408-414. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.031
- Bujold, K., Rhainds, D., Jossart, C., Febbraio, M., Marleau, S. et Ong, H. (2009). CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc Res*, 83(3), 457-464. doi: 10.1093/cvr/cvp118
- Bulgarelli, I., Tamiazzo, L., Bresciani, E., Rapetti, D., Caporali, S., Lattuada, D., Locatelli, V. et Torsello, A. (2009). Desacyl-ghrelin and synthetic GH-secretagogues modulate the production of inflammatory cytokines in mouse microglia cells stimulated by beta-amyloid fibrils. *J Neurosci Res*, 87(12), 2718-2727. doi: 10.1002/jnr.22088
- Bulluck, H., Yellon, D. M. et Hausenloy, D. J. (2016). Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities. *Heart*, 102(5), 341-348. doi: 10.1136/heartjnl-2015-307855
- Burdette, W. J. (1952). The Krebs cycle in human cardiac muscle. *Am Heart J*, 44(6), 823-829.
- Burns, R. J., Gibbons, R. J., Yi, Q., Roberts, R. S., Miller, T. D., Schaer, G. L., Anderson, J. L., Yusuf, S. et Investigators, C. S. (2002). The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial infarction treated by thrombolysis. *J Am Coll Cardiol*, 39(1), 30-36.
- Cabrera, A., Neculai, D. et Kain, K. C. (2014). CD36 and malaria: friends or foes? A decade of data provides some answers. *Trends Parasitol*, 30(9), 436-444. doi: 10.1016/j.pt.2014.07.006
- Cadenas, S. (2018). ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic Biol Med*, 117, 76-89. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.024
- Callaghan, B. et Furness, J. B. (2014). Novel and conventional receptors for ghrelin, desacyl-ghrelin, and pharmacologically related compounds. *Pharmacol Rev*, 66(4), 984-1001. doi: 10.1124/pr.113.008433
- Callaghan, B., Kosari, S., Pustovit, R. V., Sartor, D. M., Ferens, D., Ban, K., Baell, J., Nguyen, T. V., Rivera, L. R., Brock, J. A. et Furness, J. B. (2014). Hypotensive effects of ghrelin receptor agonists mediated through a novel receptor. *Br J Pharmacol*, 171(5), 1275-1286. doi: 10.1111/bph.12527
- Camina, J. P., Carreira, M. C., El Messari, S., Llorens-Cortes, C., Smith, R. G. et Casanueva, F. F. (2004). Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology*, 145(2), 930-940. doi: 10.1210/en.2003-0974
- Caminos, J. E., Nogueiras, R., Gallego, R., Bravo, S., Tovar, S., Garcia-Caballero, T., Casanueva, F. F. et Dieguez, C. (2005). Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(7), 4276-4286. doi: 10.1210/jc.2004-0930

- Campbell, S. E., Tandon, N. N., Woldegiorgis, G., Luiken, J. J., Glatz, J. F. et Bonen, A. (2004). A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J Biol Chem*, 279(35), 36235-36241. doi: 10.1074/jbc.M400566200
- Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P. et Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056-1060. doi: 10.1038/nature07813
- Canton, J., Neculai, D. et Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(9), 621-634. doi: 10.1038/nri3515
- Cao, Y., Tang, J., Yang, T., Ma, H., Yi, D., Gu, C. et Yu, S. (2013). Cardioprotective effect of ghrelin in cardiopulmonary bypass involves a reduction in inflammatory response. *PLoS One*, 8(1), e55021. doi: 10.1371/journal.pone.0055021
- Cardaci, S. et Ciriolo, M. R. (2012). TCA Cycle Defects and Cancer: When Metabolism Tunes Redox State. *Int J Cell Biol*, 2012, 161837. doi: 10.1155/2012/161837
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. et Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282(5392), 1318-1321.
- Carvajal, K., Zarrinpashneh, E., Szarszoi, O., Joubert, F., Athea, Y., Mateo, P., Gillet, B., Vaulont, S., Viollet, B., Bigard, X., Bertrand, L., Ventura-Clapier, R. et Hoerter, J. A. (2007). Dual cardiac contractile effects of the alpha2-AMPK deletion in low-flow ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(6), H3136-3147. doi: 10.1152/ajpheart.00683.2006
- Cassoni, P., Papotti, M., Ghe, C., Catapano, F., Sapino, A., Graziani, A., Deghenghi, R., Reissmann, T., Ghigo, E. et Muccioli, G. (2001). Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(4), 1738-1745. doi: 10.1210/jcem.86.4.7402
- Catalucci, D., Latronico, M. V., Ceci, M., Rusconi, F., Young, H. S., Gallo, P., Santonastasi, M., Bellacosa, A., Brown, J. H. et Condorelli, G. (2009). Akt increases sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr17. *J Biol Chem*, 284(41), 28180-28187. doi: 10.1074/jbc.M109.036566
- Chabowski, A., Chatham, J. C., Tandon, N. N., Calles-Escandon, J., Glatz, J. F., Luiken, J. J. et Bonen, A. (2006). Fatty acid transport and FAT/CD36 are increased in red but not in white skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(3), E675-682. doi: 10.1152/ajpendo.00096.2006
- Chabowski, A., Gorski, J., Luiken, J. J., Glatz, J. F. et Bonen, A. (2007). Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77(5-6), 345-353.
- Chambers, D. E., Parks, D. A., Patterson, G., Roy, R., McCord, J. M., Yoshida, S., Parmley, L. F. et Downey, J. M. (1985). Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 17(2), 145-152.
- Chan, A. Y., Dolinsky, V. W., Soltys, C. L., Viollet, B., Baksh, S., Light, P. E. et Dyck, J. R. (2008). Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *J Biol Chem*, 283(35), 24194-24201. doi: 10.1074/jbc.M802869200

- Chan, A. Y., Soltys, C. L., Young, M. E., Proud, C. G. et Dyck, J. R. (2004). Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J Biol Chem*, 279(31), 32771-32779. doi: 10.1074/jbc.M403528200
- Chanda, D., Luiken, J. J. et Glatz, J. F. (2016). Signaling pathways involved in cardiac energy metabolism. *FEBS Lett*, 590(15), 2364-2374. doi: 10.1002/1873-3468.12297
- Chen, J., Zhang, Z. et Cai, L. (2014). Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. *Diabetes Metab J*, 38(5), 337-345. doi: 10.4093/dmj.2014.38.5.337
- Chen, K., Febbraio, M., Li, W. et Silverstein, R. L. (2008). A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res*, 102(12), 1512-1519. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.172064
- Chen, S. et Li, S. (2012). The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Med Sci Monit*, 18(11), RA161-165.
- Chen, S. J., Yen, C. H., Huang, Y. C., Lee, B. J., Hsia, S. et Lin, P. T. (2012). Relationships between inflammation, adiponectin, and oxidative stress in metabolic syndrome. *PLoS One*, 7(9), e45693. doi: 10.1371/journal.pone.0045693
- Cheng, K., Chan, W. W., Barreto, A., Jr., Convey, E. M. et Smith, R. G. (1989). The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub> on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture. *Endocrinology*, 124(6), 2791-2798. doi: 10.1210/endo-124-6-2791
- Chew, D. S., Heikki, H., Schmidt, G., Kavanagh, K. M., Dommasch, M., Bloch Thomsen, P. E., Sinnecker, D., Raatikainen, P. et Exner, D. V. (2018). Change in Left Ventricular Ejection Fraction Following First Myocardial Infarction and Outcome. *JACC Clin Electrophysiol*, 4(5), 672-682. doi: 10.1016/j.jacep.2017.12.015
- Cho, S., Park, E. M., Febbraio, M., Anrather, J., Park, L., Racchumi, G., Silverstein, R. L. et Iadecola, C. (2005). The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J Neurosci*, 25(10), 2504-2512. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0035-05.2005
- Choi, K., Roh, S. G., Hong, Y. H., Shrestha, Y. B., Hishikawa, D., Chen, C., Kojima, M., Kangawa, K. et Sasaki, S. (2003). The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, 144(3), 754-759. doi: 10.1210/en.2002-220783
- Chow, K. B., Sun, J., Chu, K. M., Tai Cheung, W., Cheng, C. H. et Wise, H. (2012). The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol*, 348(1), 247-254. doi: 10.1016/j.mce.2011.08.034
- Chu, K. M., Chow, K. B., Leung, P. K., Lau, P. N., Chan, C. B., Cheng, C. H. et Wise, H. (2007). Over-expression of the truncated ghrelin receptor polypeptide attenuates the constitutive activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by ghrelin receptors but has no effect on ghrelin-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(4), 752-764. doi: 10.1016/j.biocel.2006.11.007
- Chuang, J. C., Sakata, I., Kohno, D., Perello, M., Osborne-Lawrence, S., Repa, J. J. et Zigman, J. M. (2011). Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol Endocrinol*, 25(9), 1600-1611. doi: 10.1210/me.2011-1001

- Chuang, J. C. et Zigman, J. M. (2010). Ghrelin's Roles in Stress, Mood, and Anxiety Regulation. *Int J Pept*, 2010. doi: 10.1155/2010/460549
- Cingolani, O. H. et Kass, D. A. (2011). Pressure-volume relation analysis of mouse ventricular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(6), H2198-2206. doi: 10.1152/ajpheart.00781.2011
- Clemetson, K. J., Pfueller, S. L., Luscher, E. F. et Jenkins, C. S. (1977). Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*, 464(3), 493-508.
- Cleutjens, K. B., Faber, B. C., Rousch, M., van Doorn, R., Hackeng, T. M., Vink, C., Geusens, P., ten Cate, H., Waltenberger, J., Tchaikovski, V., Lobbes, M., Somers, V., Sijbers, A., Black, D., Kitslaar, P. J. et Daemen, M. J. (2008). Noninvasive diagnosis of ruptured peripheral atherosclerotic lesions and myocardial infarction by antibody profiling. *J Clin Invest*, 118(8), 2979-2985. doi: 10.1172/JCI32767
- Clezardin, P., Frappart, L., Clerget, M., Pechoux, C. et Delmas, P. D. (1993). Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res*, 53(6), 1421-1430.
- Coburn, C. T., Knapp, F. F., Jr., Febbraio, M., Beets, A. L., Silverstein, R. L. et Abumrad, N. A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem*, 275(42), 32523-32529. doi: 10.1074/jbc.M003826200
- Codd, E. E., Shu, A. Y. et Walker, R. F. (1989). Binding of a growth hormone-releasing hexapeptide to specific hypothalamic and pituitary binding sites. *Neuropharmacology*, 28(10), 1139-1144.
- Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G. et Staels, B. (2014). Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev*, 262(1), 153-166. doi: 10.1111/imr.12218
- Coll, R. C., Robertson, A. A., Chae, J. J., Higgins, S. C., Munoz-Planillo, R., Inserra, M. C., Vetter, I., Dungan, L. S., Monks, B. G., Stutz, A., Croker, D. E., Butler, M. S., Haneklaus, M., Sutton, C. E., Nunez, G., Latz, E., Kastner, D. L., Mills, K. H., Masters, S. L., Schroder, K., Cooper, M. A. et O'Neill, L. A. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*, 21(3), 248-255. doi: 10.1038/nm.3806
- Collins, R. F., Touret, N., Kuwata, H., Tandon, N. N., Grinstein, S. et Trimble, W. S. (2009). Uptake of oxidized low density lipoprotein by CD36 occurs by an actin-dependent pathway distinct from macropinocytosis. *J Biol Chem*, 284(44), 30288-30297. doi: 10.1074/jbc.M109.045104
- Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D. et Maniatis, T. (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*, 9(10), 899-909.
- Cominacini, L., Pasini, A. F., Garbin, U., Davoli, A., Tosetti, M. L., Campagnola, M., Rigoni, A., Pastorino, A. M., Lo Cascio, V. et Sawamura, T. (2000). Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 275(17), 12633-12638.
- Conde, J., Scotece, M., Gomez, R., Lopez, V., Gomez-Reino, J. J., Lago, F. et Gualillo, O. (2011). Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among

- inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors*, 37(6), 413-420. doi: 10.1002/biof.185
- Coort, S. L., Willems, J., Coumans, W. A., van der Vusse, G. J., Bonen, A., Glatz, J. F. et Luiken, J. J. (2002). Sulfo-N-succinimidyl esters of long chain fatty acids specifically inhibit fatty acid translocase (FAT/CD36)-mediated cellular fatty acid uptake. *Mol Cell Biochem*, 239(1-2), 213-219.
- Coraci, I. S., Husemann, J., Berman, J. W., Hulette, C., Dufour, J. H., Campanella, G. K., Luster, A. D., Silverstein, S. C. et El-Khoury, J. B. (2002). CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol*, 160(1), 101-112.
- Costa, J. F., Fontes-Carvalho, R. et Leite-Moreira, A. F. (2013). Myocardial remote ischemic preconditioning: from pathophysiology to clinical application. *Rev Port Cardiol*, 32(11), 893-904. doi: 10.1016/j.repc.2013.02.012
- Crombie, R. et Silverstein, R. (1998). Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J Biol Chem*, 273(9), 4855-4863.
- Cucoranu, I., Clempus, R., Dikalova, A., Phelan, P. J., Ariyan, S., Dikalov, S. et Sorescu, D. (2005). NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*, 97(9), 900-907. doi: 10.1161/01.RES.0000187457.24338.3D
- Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E. et Weigle, D. S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50(8), 1714-1719.
- Curia, G., Lucchi, C., Vinet, J., Gualtieri, F., Marinelli, C., Torsello, A., Costantino, L. et Biagini, G. (2014). Pathophysiogenesis of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr Med Chem*, 21(6), 663-688.
- Currie, P. J., John, C. S., Nicholson, M. L., Chapman, C. D. et Loera, K. E. (2010). Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine inhibits the effects of ghrelin on eating and energy substrate utilization. *Pharmacol Biochem Behav*, 97(1), 152-155. doi: 10.1016/j.pbb.2010.05.027
- Dadson, K., Liu, Y. et Sweeney, G. (2011). Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2, 62. doi: 10.3389/fendo.2011.00062
- Dagli, A. F., Aydin, S., Karaoglu, A., Akpolat, N., Ozercan, I. H. et Ozercan, M. R. (2009). Ghrelin expression in normal kidney tissue and renal carcinomas. *Pathol Res Pract*, 205(3), 165-173. doi: 10.1016/j.prp.2008.10.002
- Dahlback, B. (2000). Blood coagulation. *Lancet*, 355(9215), 1627-1632. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02225-X
- Dalli, J. et Serhan, C. (2016). Macrophage Proresolving Mediators-the When and Where. *Microbiol Spectr*. 4(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0001-2014.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K. et Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141(11), 4255-4261. doi: 10.1210/endo.141.11.7757

- Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijjima, A., Matsuo, H., Kangawa, K. et Nakazato, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, *123*(4), 1120-1128.
- Date, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., Dezaki, K., Mondal, M. S., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Arima, T., Matsuo, H., Yada, T. et Matsukura, S. (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, *51*(1), 124-129.
- Dauphinee, S. M. et Karsan, A. (2006). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*, *86*(1), 9-22. doi: 10.1038/labinvest.3700366
- Davenport, A. P., Bonner, T. I., Foord, S. M., Harmar, A. J., Neubig, R. R., Pin, J. P., Spedding, M., Kojima, M. et Kangawa, K. (2005). International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev*, *57*(4), 541-546. doi: 10.1124/pr.57.4.1
- Davidson, S. M., Hausenloy, D., Duchon, M. R. et Yellon, D. M. (2006). Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol*, *38*(3), 414-419. doi: 10.1016/j.biocel.2005.09.017
- Davies, P. F. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, *75*(3), 519-560. doi: 10.1152/physrev.1995.75.3.519
- Davis, E. J., Spydevold, O. et Bremer, J. (1980). Pyruvate carboxylase and propionyl-CoA carboxylase as anaplerotic enzymes in skeletal muscle mitochondria. *Eur J Biochem*, *110*(1), 255-262.
- Dawn, B., Xuan, Y. T., Guo, Y., Rezazadeh, A., Stein, A. B., Hunt, G., Wu, W. J., Tan, W. et Bolli, R. (2004). IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res*, *64*(1), 61-71. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.05.011
- De Gennaro Colonna, V., Rossoni, G., Bernareggi, M., Muller, E. E. et Berti, F. (1997a). Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol*, *334*(2-3), 201-207.
- De Gennaro Colonna, V., Rossoni, G., Bernareggi, M., Muller, E. E. et Berti, F. (1997b). Hexarelin, a growth hormone-releasing peptide, discloses protectant activity against cardiovascular damage in rats with isolated growth hormone deficiency. *Cardiologia*, *42*(11), 1165-1172.
- de la Cour, C. D., Norlen, P. et Hakanson, R. (2007). Secretion of ghrelin from rat stomach ghrelin cells in response to local microinfusion of candidate messenger compounds: a microdialysis study. *Regul Pept*, *143*(1-3), 118-126. doi: 10.1016/j.regpep.2007.05.001
- De Vriese, C., Hacquebard, M., Gregoire, F., Carpentier, Y. et Delporte, C. (2007). Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology*, *148*(5), 2355-2362. doi: 10.1210/en.2006-1281
- Deghenghi, R., Cananzi, M. M., Torsello, A., Battisti, C., Muller, E. E. et Locatelli, V. (1994). GH-releasing activity of Hexarelin, a new growth hormone-releasing peptide, in infant and adult rats. *Life Sci*, *54*(18), 1321-1328.
- Dehn, S. et Thorp, E. B. (2018). Myeloid receptor CD36 is required for early phagocytosis of myocardial infarcts and induction of Nr4a1-dependent mechanisms of cardiac repair. *FASEB J*, *32*(1), 254-264. doi: 10.1096/fj.201700450R

- Delhanty, P. J., Huisman, M., Baldeon-Rojas, L. Y., van den Berge, I., Grefhorst, A., Abribat, T., Leenen, P. J., Themmen, A. P. et van der Lely, A. J. (2013). Des-acyl ghrelin analogs prevent high-fat-diet-induced dysregulation of glucose homeostasis. *FASEB J*, 27(4), 1690-1700. doi: 10.1096/fj.12-221143
- Demers, A., McNicoll, N., Febbraio, M., Servant, M., Marleau, S., Silverstein, R. et Ong, H. (2004). Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J*, 382(Pt 2), 417-424. doi: 10.1042/BJ20040036
- Demers, A., Rodrigue-Way, A. et Tremblay, A. (2008). Hexarelin Signaling to PPARgamma in Metabolic Diseases. *PPAR Res*, 2008, 364784. doi: 10.1155/2008/364784
- Denzel, M. S., Scimia, M. C., Zumstein, P. M., Walsh, K., Ruiz-Lozano, P. et Ranscht, B. (2010). T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest*, 120(12), 4342-4352. doi: 10.1172/JCI43464
- Depre, C., Rider, M. H. et Hue, L. (1998). Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem*, 258(2), 277-290.
- Dezaki, K. (2013). Ghrelin function in insulin release and glucose metabolism. *Endocr Dev*, 25, 135-143. doi: 10.1159/000346064
- Di, L. (2015). Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *AAPS J*, 17(1), 134-143. doi: 10.1208/s12248-014-9687-3
- Diano, S., Farr, S. A., Benoit, S. C., McNay, E. C., da Silva, I., Horvath, B., Gaskin, F. S., Nonaka, N., Jaeger, L. B., Banks, W. A., Morley, J. E., Pinto, S., Sherwin, R. S., Xu, L., Yamada, K. A., Sleeman, M. W., Tschop, M. H. et Horvath, T. L. (2006). Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci*, 9(3), 381-388. doi: 10.1038/nn1656
- Ding, G., Qin, Q., He, N., Francis-David, S. C., Hou, J., Liu, J., Ricks, E. et Yang, Q. (2007). Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Cell Cardiol*, 43(1), 73-84. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.04.014
- Ding, H. S., Yang, J., Chen, P., Yang, J., Bo, S. Q., Ding, J. W. et Yu, Q. Q. (2013). The HMGB1-TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis. *Gene*, 527(1), 389-393. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.041
- Dixit, V. D., Yang, H., Sun, Y., Weeraratna, A. T., Youm, Y. H., Smith, R. G. et Taub, D. D. (2007). Ghrelin promotes thymopoiesis during aging. *J Clin Invest*, 117(10), 2778-2790. doi: 10.1172/JCI30248
- Doens, D., Valiente, P. A., Mfuh, A. M., A, X. T. V., Tristan, A., Carreno, L., Quijada, M., Nguyen, V. T., Perry, G., Larionov, O. V., Lleonart, R. et Fernandez, P. L. (2017). Identification of Inhibitors of CD36-Amyloid Beta Binding as Potential Agents for Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci*, 8(6), 1232-1241. doi: 10.1021/acschemneuro.6b00386
- Dorweiler, B., Pruefer, D., Andradi, T. B., Maksan, S. M., Schmiedt, W., Neufang, A. et Vahl, C. F. (2007). Ischemia-Reperfusion Injury : Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 33(6), 600-612. doi: 10.1007/s00068-007-7152-z
- Drover, V. A., Ajmal, M., Nassir, F., Davidson, N. O., Nauli, A. M., Sahoo, D., Tso, P. et Abumrad, N. A. (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance

- of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest*, 115(5), 1290-1297. doi: 10.1172/JCI21514
- Drover, V. A., Nguyen, D. V., Bastie, C. C., Darlington, Y. F., Abumrad, N. A., Pessin, J. E., London, E., Sahoo, D. et Phillips, M. C. (2008). CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem*, 283(19), 13108-13115. doi: 10.1074/jbc.M708086200
- Duan, J., Zhang, H. Y., Adkins, S. D., Ren, B. H., Norby, F. L., Zhang, X., Benoit, J. N., Epstein, P. N. et Ren, J. (2003). Impaired cardiac function and IGF-I response in myocytes from calmodulin-diabetic mice: role of Akt and RhoA. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(2), E366-376. doi: 10.1152/ajpendo.00254.2002
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, V. et Latz, E. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 464(7293), 1357-1361. doi: 10.1038/nature08938
- Duncan, R. E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E. et Sul, H. S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*, 27, 79-101. doi: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734
- Dyck, J. R. et Lopaschuk, G. D. (2006). AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol*, 574(Pt 1), 95-112. doi: 10.1113/jphysiol.2006.109389
- Echeverria, F., Ortiz, M., Valenzuela, R. et Videla, L. A. (2016). Long-chain polyunsaturated fatty acids regulation of PPARs, signaling: Relationship to tissue development and aging. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 114, 28-34. doi: 10.1016/j.plefa.2016.10.001
- Ed Rainger, G., Chimen, M., Harrison, M. J., Yates, C. M., Harrison, P., Watson, S. P., Lordkipanidze, M. et Nash, G. B. (2015). The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*, 26(6), 507-520. doi: 10.3109/09537104.2015.1064881
- Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang, M. K., Wek, S. A., Moos, M. C., Jr. et Londos, C. (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(18), 8537-8541.
- El Eter, E., Al Tuwaijiri, A., Hagar, H. et Arafa, M. (2007). In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*, 22(11), 1791-1799. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04696.x
- Ellis, J. M., Mentock, S. M., Depetrillo, M. A., Koves, T. R., Sen, S., Watkins, S. M., Muoio, D. M., Cline, G. W., Taegtmeyer, H., Shulman, G. I., Willis, M. S. et Coleman, R. A. (2011). Mouse cardiac acyl coenzyme a synthetase 1 deficiency impairs Fatty Acid oxidation and induces cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol*, 31(6), 1252-1262. doi: 10.1128/MCB.01085-10
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T. et Protter, A. A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 268(16), 11811-11816.
- Ertan, C., Ozpelit, M. E., Limon, O., Oray, D. et Pekel, N. (2017). Vasospastic myocardial infarction: An even rarer occurrence of a rare entity. *World J Emerg Med*, 8(1), 68-70. doi: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2017.01.013

- Esler, W. P., Rudolph, J., Claus, T. H., Tang, W., Barucci, N., Brown, S. E., Bullock, W., Daly, M., Decarr, L., Li, Y., Milardo, L., Molstad, D., Zhu, J., Gardell, S. J., Livingston, J. N. et Sweet, L. J. (2007). Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. *Endocrinology*, *148*(11), 5175-5185. doi: 10.1210/en.2007-0239
- Essick, E. E., Ouchi, N., Wilson, R. M., Ohashi, K., Ghobrial, J., Shibata, R., Pimentel, D. R. et Sam, F. (2011). Adiponectin mediates cardioprotection in oxidative stress-induced cardiac myocyte remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *301*(3), H984-993. doi: 10.1152/ajpheart.00428.2011
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y. et Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, *101*(4), 890-898. doi: 10.1172/JCI1112
- Fadok, V. A., Warner, M. L., Bratton, D. L. et Henson, P. M. (1998). CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol*, *161*(11), 6250-6257.
- Fang, X., Palanivel, R., Cresser, J., Schram, K., Ganguly, R., Thong, F. S., Tuinei, J., Xu, A., Abel, E. D. et Sweeney, G. (2010). An APPL1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectin in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *299*(5), E721-729. doi: 10.1152/ajpendo.00086.2010
- Fantuzzi, G. (2008). Adiponectin and inflammation: consensus and controversy. *J Allergy Clin Immunol*, *121*(2), 326-330. doi: 10.1016/j.jaci.2007.10.018
- Fathil, M. F., Md Arshad, M. K., Gopinath, S. C., Hashim, U., Adzhri, R., Ayub, R. M., Ruslinda, A. R., Nuzaihan, M. N. M., Azman, A. H., Zaki, M. et Tang, T. H. (2015). Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers. *Biosens Bioelectron*, *70*, 209-220. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.037
- Febbraio, M., Abumrad, N. A., Hajjar, D. P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S. F. et Silverstein, R. L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, *274*(27), 19055-19062.
- Febbraio, M., Guy, E. et Silverstein, R. L. (2004). Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *24*(12), 2333-2338. doi: 10.1161/01.ATV.0000148007.06370.68
- Febbraio, M., Hajjar, D. P. et Silverstein, R. L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, *108*(6), 785-791. doi: 10.1172/JCI14006
- Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K. et Silverstein, R. L. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, *105*(8), 1049-1056. doi: 10.1172/JCI9259
- Febbraio, M. et Silverstein, R. L. (2007). CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol*, *39*(11), 2012-2030. doi: 10.1016/j.biocel.2007.03.012
- Fei, W., Du, X. et Yang, H. (2011). Seipin, adipogenesis and lipid droplets. *Trends Endocrinol Metab*, *22*(6), 204-210. doi: 10.1016/j.tem.2011.02.004
- Feighner, S. D., Howard, A. D., Prendergast, K., Palyha, O. C., Hreniuk, D. L., Nargund, R., Underwood, D., Tata, J. R., Dean, D. C., Tan, C. P., McKee, K. K., Woods, J. W.,

- Patchett, A. A., Smith, R. G. et Van der Ploeg, L. H. (1998). Structural requirements for the activation of the human growth hormone secretagogue receptor by peptide and nonpeptide secretagogues. *Mol Endocrinol*, 12(1), 137-145. doi: 10.1210/mend.12.1.0051
- Feighner, S. D., Tan, C. P., McKee, K. K., Palyha, O. C., Hreniuk, D. L., Pong, S. S., Austin, C. P., Figueroa, D., MacNeil, D., Cascieri, M. A., Nargund, R., Bakshi, R., Abramovitz, M., Stocco, R., Kargman, S., O'Neill, G., Van Der Ploeg, L. H., Evans, J., Patchett, A. A., Smith, R. G. et Howard, A. D. (1999). Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science*, 284(5423), 2184-2188.
- Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., Hegele, R. A., Krauss, R. M., Raal, F. J., Schunkert, H., Watts, G. F., Boren, J., Fazio, S., Horton, J. D., Masana, L., Nicholls, S. J., Nordestgaard, B. G., van de Sluis, B., Taskinen, M. R., Tokgozoglu, L., Landmesser, U., Laufs, U., Wiklund, O., Stock, J. K., Chapman, M. J. et Catapano, A. L. (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*, 38(32), 2459-2472. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144
- Fernandez-Hernando, C., Ackah, E., Yu, J., Suarez, Y., Murata, T., Iwakiri, Y., Prendergast, J., Miao, R. Q., Birnbaum, M. J. et Sessa, W. C. (2007). Loss of Akt1 leads to severe atherosclerosis and occlusive coronary artery disease. *Cell Metab*, 6(6), 446-457. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.007
- Ferrari, R., Balla, C., Malagu, M., Guardigli, G., Morciano, G., Bertini, M., Biscaglia, S. et Campo, G. (2017). Reperfusion Damage- A Story of Success, Failure, and Hope. *Circ J*, 81(2), 131-141. doi: 10.1253/circj.CJ-16-1124
- Fioravanti, J., Medina-Echeverez, J. et Berraondo, P. (2011). Scavenger receptor class B, type I: a promising immunotherapy target. *Immunotherapy*, 3(3), 395-406. doi: 10.2217/imt.10.104
- Fisher, E. A., Feig, J. E., Hewing, B., Hazen, S. L. et Smith, J. D. (2012). High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(12), 2813-2820. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300133
- Fisslthaler, B., Benzing, T., Busse, R. et Fleming, I. (2003). Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. *Nitric Oxide*, 8(4), 253-261.
- Flachskampf, F. A., Schmid, M., Rost, C., Achenbach, S., DeMaria, A. N. et Daniel, W. G. (2011). Cardiac imaging after myocardial infarction. *Eur Heart J*, 32(3), 272-283. doi: 10.1093/eurheartj/ehq446
- Flogel, U., Ding, Z., Hardung, H., Jander, S., Reichmann, G., Jacoby, C., Schubert, R. et Schrader, J. (2008). In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation*, 118(2), 140-148. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.737890
- Floquet, N., M'Kadmi, C., Perahia, D., Gagne, D., Berge, G., Marie, J., Baneres, J. L., Galleyrand, J. C., Fehrentz, J. A. et Martinez, J. (2010). Activation of the ghrelin receptor is described by a privileged collective motion: a model for constitutive and agonist-induced activation of a sub-class A G-protein coupled receptor (GPCR). *J Mol Biol*, 395(4), 769-784. doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.051

- Frieda, S., Pearce, A., Wu, J. et Silverstein, R. L. (1995). Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36. *J Biol Chem*, 270(7), 2981-2986.
- Fruchart, J. C., Duriez, P. et Staels, B. (1999). [Molecular mechanism of action of the fibrates]. *J Soc Biol*, 193(1), 67-75.
- Fruhirth, G. O., Moutzi, A., Loidl, A., Ingolic, E. et Hermetter, A. (2006). The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1761(9), 1060-1069. doi: 10.1016/j.bbaliip.2006.06.001
- Fukushima, N., Hanada, R., Teranishi, H., Fukue, Y., Tachibana, T., Ishikawa, H., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kangawa, K., Nagata, K. et Kojima, M. (2005). Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res*, 20(5), 790-798. doi: 10.1359/JBMR.041237
- Fukuwatari, T., Kawada, T., Tsuruta, M., Hiraoka, T., Iwanaga, T., Sugimoto, E. et Fushiki, T. (1997). Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett*, 414(2), 461-464.
- Gagnon, J. et Anini, Y. (2012). Insulin and norepinephrine regulate ghrelin secretion from a rat primary stomach cell culture. *Endocrinology*, 153(8), 3646-3656. doi: 10.1210/en.2012-1040
- Gagnon, J. et Anini, Y. (2013). Glucagon stimulates ghrelin secretion through the activation of MAPK and EPAC and potentiates the effect of norepinephrine. *Endocrinology*, 154(2), 666-674. doi: 10.1210/en.2012-1994
- Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Kranzhofer, R., Clark, S. et Libby, P. (1995). Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(2), 402-406.
- Galkina, E. et Ley, K. (2007). Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(11), 2292-2301. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.149179
- Gao, D., Ashraf, M. Z., Kar, N. S., Lin, D., Sayre, L. M. et Podrez, E. A. (2010). Structural basis for the recognition of oxidized phospholipids in oxidized low density lipoproteins by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J Biol Chem*, 285(7), 4447-4454. doi: 10.1074/jbc.M109.082800
- Gao, G., Fernandez, C. S., Stapleton, D., Auster, A. S., Widmer, J., Dyck, J. R., Kemp, B. E. et Witters, L. A. (1996). Non-catalytic beta- and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 271(15), 8675-8681.
- Garcia-Bonilla, L., Benakis, C., Moore, J., Iadecola, C. et Anrather, J. (2014). Immune mechanisms in cerebral ischemic tolerance. *Front Neurosci*, 8, 44. doi: 10.3389/fnins.2014.00044
- Garcia-Dorado, D., Andres-Villarreal, M., Ruiz-Meana, M., Inserte, J. et Barba, I. (2012). Myocardial edema: a translational view. *J Mol Cell Cardiol*, 52(5), 931-939. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.01.010
- Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Duran, J. M., Solares, J., Alonso, J., Sanz, E., Munoz, R., Elizaga, J., Botas, J., Fernandez-Aviles, F. et et al. (1992). Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*, 85(3), 1160-1174.

- Garlid, K. D., Dos Santos, P., Xie, Z. J., Costa, A. D. et Paucek, P. (2003). Mitochondrial potassium transport: the role of the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel in cardiac function and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta*, 1606(1-3), 1-21.
- Gauna, C., Kiewiet, R. M., Janssen, J. A., van de Zande, B., Delhanty, P. J., Ghigo, E., Hofland, L. J., Themmen, A. P. et van der Lely, A. J. (2007). Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(3), E697-704. doi: 10.1152/ajpendo.00219.2007
- Gauna, C., Meyler, F. M., Janssen, J. A., Delhanty, P. J., Abribat, T., van Koetsveld, P., Hofland, L. J., Broglio, F., Ghigo, E. et van der Lely, A. J. (2004). Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(10), 5035-5042. doi: 10.1210/jc.2004-0363
- Gauna, C., van de Zande, B., van Kerkwijk, A., Themmen, A. P., van der Lely, A. J. et Delhanty, P. J. (2007). Unacylated ghrelin is not a functional antagonist but a full agonist of the type 1a growth hormone secretagogue receptor (GHS-R). *Mol Cell Endocrinol*, 274(1-2), 30-34. doi: 10.1016/j.mce.2007.05.010
- Gauna, C. et van der Lely, A. J. (2005). Somatostatin, cortistatin, ghrelin and glucose metabolism. *J Endocrinol Invest*, 28(11 Suppl International), 127-131.
- Gautam, S. et Banerjee, M. (2011). The macrophage Ox-LDL receptor, CD36 and its association with type II diabetes mellitus. *Mol Genet Metab*, 102(4), 389-398. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.12.012
- Ge, L., Zhou, X., Ji, W. J., Lu, R. Y., Zhang, Y., Zhang, Y. D., Ma, Y. Q., Zhao, J. H. et Li, Y. M. (2015). Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308(5), H500-509. doi: 10.1152/ajpheart.00381.2014
- Geng, Y. J., Henderson, L. E., Levesque, E. B., Muszynski, M. et Libby, P. (1997). Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(10), 2200-2208.
- George, J. et Struthers, A. D. (2009). Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc Health Risk Manag*, 5(1), 265-272.
- Georgiadi, A. et Kersten, S. (2012). Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv Nutr*, 3(2), 127-134. doi: 10.3945/an.111.001602
- Gersh, B. J., Stone, G. W., White, H. D. et Holmes, D. R., Jr. (2005). Pharmacological facilitation of primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: is the slope of the curve the shape of the future? *JAMA*, 293(8), 979-986. doi: 10.1001/jama.293.8.979
- Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., Luster, A. D., Luscinskas, F. W. et Rosenzweig, A. (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398(6729), 718-723. doi: 10.1038/19546
- Gho, B. C., Schoemaker, R. G., van den Doel, M. A., Duncker, D. J. et Verdouw, P. D. (1996). Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*, 94(9), 2193-2200.
- Gil-Campos, M., Aguilera, C. M., Canete, R. et Gil, A. (2006). Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br J Nutr*, 96(2), 201-226.

- Gillum, M. P., Kotas, M. E., Erion, D. M., Kursawe, R., Chatterjee, P., Nead, K. T., Muise, E. S., Hsiao, J. J., Frederick, D. W., Yonemitsu, S., Banks, A. S., Qiang, L., Bhanot, S., Olefsky, J. M., Sears, D. D., Caprio, S. et Shulman, G. I. (2011). SirT1 regulates adipose tissue inflammation. *Diabetes*, *60*(12), 3235-3245. doi: 10.2337/db11-0616
- Gilson, W. D. et Kraitchman, D. L. (2009). Noninvasive cardiovascular imaging techniques for basic science research: application to cellular therapeutics. *Rev Esp Cardiol*, *62*(8), 918-927.
- Gimbrone, M. A., Jr. et Garcia-Cardena, G. (2013). Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*, *22*(1), 9-15. doi: 10.1016/j.carpath.2012.06.006
- Gimbrone, M. A., Jr., Topper, J. N., Nagel, T., Anderson, K. R. et Garcia-Cardena, G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, *902*, 230-239; discussion 239-240.
- Glatz, J. F., Luiken, J. J. et Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev*, *90*(1), 367-417. doi: 10.1152/physrev.00003.2009
- Glatz, J. F., Nabben, M., Heather, L. C., Bonen, A. et Luiken, J. J. (2016). Regulation of the subcellular trafficking of CD36, a major determinant of cardiac fatty acid utilization. *Biochim Biophys Acta*, *1861*(10), 1461-1471. doi: 10.1016/j.bbali.2016.04.008
- Glatz, J. F. C. et Luiken, J. (2018). Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. *J Lipid Res*, *59*(7), 1084-1093. doi: 10.1194/jlr.R082933
- Gloire, G., Legrand-Poels, S. et Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*, *72*(11), 1493-1505. doi: 10.1016/j.bcp.2006.04.011
- Glower, D. D., Spratt, J. A., Snow, N. D., Kabas, J. S., Davis, J. W., Olsen, C. O., Tyson, G. S., Sabiston, D. C., Jr. et Rankin, J. S. (1985). Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work. *Circulation*, *71*(5), 994-1009.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S. A., Morris, D. G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A. B. et Korbonits, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, *87*(6), 2988. doi: 10.1210/jcem.87.6.8739
- Gonon, A. T., Widegren, U., Bulhak, A., Salehzadeh, F., Persson, J., Sjoquist, P. O. et Pernow, J. (2008). Adiponectin protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury via AMP-activated protein kinase, Akt, and nitric oxide. *Cardiovasc Res*, *78*(1), 116-122. doi: 10.1093/cvr/cvn017
- Gonzalvez, M., Ruiz-Ros, J. A., Perez-Paredes, M., Lozano, M. L., Garcia-Almagro, F. J., Martinez-Corbalan, F., Gimenez, D. M., Carrillo, A., Carnero, A., Cubero, T., Gonzalvez, J. J., Urena, I. et Vicente, V. (2007). [Prognostic value of tumor necrosis factor-alpha in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol*, *60*(12), 1233-1241.
- Gorrini, C., Harris, I. S. et Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*, *12*(12), 931-947. doi: 10.1038/nrd4002
- Gortan Cappellari, G., Zanetti, M., Semolic, A., Vinci, P., Ruozi, G., Falcione, A., Filigheddu, N., Guarnieri, G., Graziani, A., Giacca, M. et Barazzoni, R. (2016). Unacylated Ghrelin

- Reduces Skeletal Muscle Reactive Oxygen Species Generation and Inflammation and Prevents High-Fat Diet-Induced Hyperglycemia and Whole-Body Insulin Resistance in Rodents. *Diabetes*, 65(4), 874-886. doi: 10.2337/db15-1019
- Gouverneur, M., Berg, B., Nieuwdorp, M., Stroes, E. et Vink, H. (2006). Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress. *J Intern Med*, 259(4), 393-400. doi: 10.1111/j.1365-2796.2006.01625.x
- Granata, R., Settanni, F., Biancone, L., Trovato, L., Nano, R., Bertuzzi, F., Destefanis, S., Annunziata, M., Martinetti, M., Catapano, F., Ghe, C., Isgaard, J., Papotti, M., Ghigo, E. et Muccioli, G. (2007). Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology*, 148(2), 512-529. doi: 10.1210/en.2006-0266
- Granata, R., Settanni, F., Julien, M., Nano, R., Togliatto, G., Trombetta, A., Gallo, D., Piemonti, L., Brizzi, M. F., Aribat, T., van Der Lely, A. J. et Ghigo, E. (2012). Des-acyl ghrelin fragments and analogues promote survival of pancreatic beta-cells and human pancreatic islets and prevent diabetes in streptozotocin-treated rats. *J Med Chem*, 55(6), 2585-2596. doi: 10.1021/jm201223m
- Granger, D. N. et Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 6, 524-551. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.020
- Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Garty, N. B., Blanchette-Mackie, E. J. et Londos, C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*, 266(17), 11341-11346.
- Greenberg, M. E., Li, X. M., Gugiu, B. G., Gu, X., Qin, J., Salomon, R. G. et Hazen, S. L. (2008). The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J Biol Chem*, 283(4), 2385-2396. doi: 10.1074/jbc.M707348200
- Greenlee, W. J., Thorsett, E. D., Springer, J. P., Patchett, A. A., Ulm, E. H. et Vassil, T. C. (1984). Azapeptides: a new class of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 122(2), 791-797.
- Griffin, E., Re, A., Hamel, N., Fu, C., Bush, H., McCaffrey, T. et Asch, A. S. (2001). A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med*, 7(7), 840-846. doi: 10.1038/89969
- Grimaldi, P. A., Teboul, L., Gaillard, D., Armengod, A. V. et Amri, E. Z. (1999). Long chain fatty acids as modulators of gene transcription in preadipose cells. *Mol Cell Biochem*, 192(1-2), 63-68.
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P. et Rollins, B. J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, 2(2), 275-281.
- Guan, X. M., Yu, H., Palyha, O. C., McKee, K. K., Feighner, S. D., Sirinathsinghji, D. J., Smith, R. G., Van der Ploeg, L. H. et Howard, A. D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*, 48(1), 23-29.
- Gueorguiev, M. et Korbonits, M. (2013). Genetics of the ghrelin system. *Endocr Dev*, 25, 25-40. doi: 10.1159/000348665

- Guicciardi, M. E. et Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *FASEB J*, 23(6), 1625-1637. doi: 10.1096/fj.08-111005
- Guillemin, R., Brazeau, P., Bohlen, P., Esch, F., Ling, N. et Wehrenberg, W. B. (1982). Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science*, 218(4572), 585-587.
- Guo, H., Callaway, J. B. et Ting, J. P. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*, 21(7), 677-687. doi: 10.1038/nm.3893
- Guo, M., Li, C., Lei, Y., Xu, S., Zhao, D. et Lu, X. Y. (2017). Role of the adipose PPARgamma-adiponectin axis in susceptibility to stress and depression/anxiety-related behaviors. *Mol Psychiatry*, 22(7), 1056-1068. doi: 10.1038/mp.2016.225
- Guo, S., Olm-Shipman, A., Walters, A., Urciuoli, W. R., Devito, S., Nadtochiy, S. M., Wojtovich, A. P. et Brookes, P. S. (2012). A cell-based phenotypic assay to identify cardioprotective agents. *Circ Res*, 110(7), 948-957. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.263715
- Guthmann, F., Maehl, P., Preiss, J., Kolleck, I. et Rustow, B. (2002). Ectoprotein kinase-mediated phosphorylation of FAT/CD36 regulates palmitate uptake by human platelets. *Cell Mol Life Sci*, 59(11), 1999-2003.
- Gutierrez, J. A., Solenberg, P. J., Perkins, D. R., Willency, J. A., Knierman, M. D., Jin, Z., Witcher, D. R., Luo, S., Onyia, J. E. et Hale, J. E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(17), 6320-6325. doi: 10.1073/pnas.0800708105
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. et Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30(2), 214-226. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.003
- Hajri, T., Hall, A. M., Jensen, D. R., Pietka, T. A., Drover, V. A., Tao, H., Eckel, R. et Abumrad, N. A. (2007). CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes*, 56(7), 1872-1880. doi: 10.2337/db06-1699
- Halestrap, A. P. (2010). A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans*, 38(4), 841-860. doi: 10.1042/BST0380841
- Hamacher-Brady, A., Brady, N. R. et Gottlieb, R. A. (2006). The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther*, 20(6), 445-462. doi: 10.1007/s10557-006-0583-7
- Hamdani, N., Kooij, V., van Dijk, S., Merkus, D., Paulus, W. J., Remedios, C. D., Duncker, D. J., Stienen, G. J. et van der Velden, J. (2008). Sarcomeric dysfunction in heart failure. *Cardiovasc Res*, 77(4), 649-658. doi: 10.1093/cvr/cvm079
- Hamik, A., Lin, Z., Kumar, A., Balcells, M., Sinha, S., Katz, J., Feinberg, M. W., Gerzsten, R. E., Edelman, E. R. et Jain, M. K. (2007). Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *J Biol Chem*, 282(18), 13769-13779. doi: 10.1074/jbc.M700078200
- Hamilton, J. A. (2007). New insights into the roles of proteins and lipids in membrane transport of fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 77(5-6), 355-361. doi: 10.1016/j.plefa.2007.10.020
- Han, J., Hajjar, D. P., Febbraio, M. et Nicholson, A. C. (1997). Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem*, 272(34), 21654-21659.

- Han, X. X., Chabowski, A., Tandon, N. N., Calles-Escandon, J., Glatz, J. F., Luiken, J. J. et Bonen, A. (2007). Metabolic challenges reveal impaired fatty acid metabolism and translocation of FAT/CD36 but not FABPpm in obese Zucker rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2), E566-575. doi: 10.1152/ajpendo.00106.2007
- Hankins, H. M., Baldrige, R. D., Xu, P. et Graham, T. R. (2015). Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic*, 16(1), 35-47. doi: 10.1111/tra.12233
- Hansson, G. K. (2001). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(12), 1876-1890.
- Hara, A. et Abiko, Y. (1996). Role of the sympathetic nervous system in the ischemic and reperfused heart. *EXS*, 76, 285-297.
- Harb, D., Bujold, K., Febbraio, M., Sirois, M. G., Ong, H. et Marleau, S. (2009). The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc Res*, 83(1), 42-51. doi: 10.1093/cvr/cvp081
- Hardie, D. G. (1992). Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism by the AMP-activated protein kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1123(3), 231-238.
- Hardie, D. G. et Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*, 246(2), 259-273.
- Harisseh, R., Pillot, B., Gharib, A., Augeul, L., Gallo-Bona, N., Ferrera, R., Loufouat, J., Delale, T., Allas, S., Aribat, T., Crola Da Silva, C. et Ovize, M. (2017). Unacylated ghrelin analog prevents myocardial reperfusion injury independently of permeability transition pore. *Basic Res Cardiol*, 112(1), 4. doi: 10.1007/s00395-016-0595-9
- Harmon, C. M. et Abumrad, N. A. (1993). Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J Membr Biol*, 133(1), 43-49.
- Harmon, C. M., Luce, P., Beth, A. H. et Abumrad, N. A. (1991). Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *J Membr Biol*, 121(3), 261-268.
- Hashmi, S. et Al-Salam, S. (2015). Acute myocardial infarction and myocardial ischemia-reperfusion injury: a comparison. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(8), 8786-8796.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 54, 1015-1069. doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.005055
- Hatmi, M., Gavaret, J. M., Elalamy, I., Vargaftig, B. B. et Jacquemin, C. (1996). Evidence for cAMP-dependent platelet ectoprotein kinase activity that phosphorylates platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*, 271(40), 24776-24780.
- Hausenloy, D. J. (2013). Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science). *Curr Pharm Des*, 19(25), 4544-4563.
- Hausenloy, D. J., Botker, H. E., Engstrom, T., Erlinge, D., Heusch, G., Ibanez, B., Kloner, R. A., Ovize, M., Yellon, D. M. et Garcia-Dorado, D. (2017). Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations. *Eur Heart J*, 38(13), 935-941. doi: 10.1093/eurheartj/ehw145
- Hausenloy, D. J. et Yellon, D. M. (2004). New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*, 61(3), 448-460. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.024

- Hazen, S. L. et Heinecke, J. W. (1997). 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest*, 99(9), 2075-2081. doi: 10.1172/JCI119379
- He, J., Lee, J. H., Febbraio, M. et Xie, W. (2011). The emerging roles of fatty acid translocase/CD36 and the aryl hydrocarbon receptor in fatty liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)*, 236(10), 1116-1121. doi: 10.1258/ebm.2011.011128
- Heit, B., Kim, H., Cosio, G., Castano, D., Collins, R., Lowell, C. A., Kain, K. C., Trimble, W. S. et Grinstein, S. (2013). Multimolecular signaling complexes enable Syk-mediated signaling of CD36 internalization. *Dev Cell*, 24(4), 372-383. doi: 10.1016/j.devcel.2013.01.007
- Heppner, K. M., Piechowski, C. L., Muller, A., Ottaway, N., Sisley, S., Smiley, D. L., Habegger, K. M., Pfluger, P. T., Dimarchi, R., Biebermann, H., Tschop, M. H., Sandoval, D. A. et Perez-Tilve, D. (2014). Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors. *Diabetes*, 63(1), 122-131. doi: 10.2337/db13-0414
- Hernando, V., Inverte, J., Sartorio, C. L., Parra, V. M., Poncelas-Nozal, M. et Garcia-Dorado, D. (2010). Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 49(2), 271-279. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.02.024
- Herr, D. J., Aune, S. E. et Menick, D. R. (2015). Induction and Assessment of Ischemia-reperfusion Injury in Langendorff-perfused Rat Hearts. *J Vis Exp*(101), e52908. doi: 10.3791/52908
- Heusch, G. (2015). Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*, 116(4), 674-699. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305348
- Heusch, G. (2016). The Coronary Circulation as a Target of Cardioprotection. *Circ Res*, 118(10), 1643-1658. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308640
- Heusch, G., Libby, P., Gersh, B., Yellon, D., Bohm, M., Lopaschuk, G. et Opie, L. (2014). Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet*, 383(9932), 1933-1943. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60107-0
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U. et Beutler, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, 433(7025), 523-527. doi: 10.1038/nature03253
- Holland, W. L., Miller, R. A., Wang, Z. V., Sun, K., Barth, B. M., Bui, H. H., Davis, K. E., Bikman, B. T., Halberg, N., Rutkowski, J. M., Wade, M. R., Tenorio, V. M., Kuo, M. S., Brozinick, J. T., Zhang, B. B., Birnbaum, M. J., Summers, S. A. et Scherer, P. E. (2011). Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med*, 17(1), 55-63. doi: 10.1038/nm.2277
- Holliday, N. D., Holst, B., Rodionova, E. A., Schwartz, T. W. et Cox, H. M. (2007). Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor. *Mol Endocrinol*, 21(12), 3100-3112. doi: 10.1210/me.2007-0254
- Holloway, G. P., Benton, C. R., Mullen, K. L., Yoshida, Y., Snook, L. A., Han, X. X., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Lally, J., Dyck, D. J. et Bonen, A. (2009). In obese rat muscle transport of palmitate is increased and is channeled to triacylglycerol storage despite an increase in mitochondrial palmitate oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(4), E738-747. doi: 10.1152/ajpendo.90896.2008

- Holloway, G. P., Bezaire, V., Heigenhauser, G. J., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Bonen, A. et Spriet, L. L. (2006). Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *J Physiol*, 571(Pt 1), 201-210. doi: 10.1113/jphysiol.2005.102178
- Holloway, G. P., Jain, S. S., Bezaire, V., Han, X. X., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Harper, M. E. et Bonen, A. (2009). FAT/CD36-null mice reveal that mitochondrial FAT/CD36 is required to upregulate mitochondrial fatty acid oxidation in contracting muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297(4), R960-967. doi: 10.1152/ajpregu.91021.2008
- Holloway, G. P., Lally, J., Nickerson, J. G., Alkhateeb, H., Snook, L. A., Heigenhauser, G. J., Calles-Escandon, J., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Spriet, L. L. et Bonen, A. (2007). Fatty acid binding protein facilitates sarcolemmal fatty acid transport but not mitochondrial oxidation in rat and human skeletal muscle. *J Physiol*, 582(Pt 1), 393-405. doi: 10.1113/jphysiol.2007.135301
- Holloway, G. P., Luiken, J. J., Glatz, J. F., Spriet, L. L. et Bonen, A. (2008). Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol (Oxf)*, 194(4), 293-309. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01878.x
- Holloway, G. P., Thrush, A. B., Heigenhauser, G. J., Tandon, N. N., Dyck, D. J., Bonen, A. et Spriet, L. L. (2007). Skeletal muscle mitochondrial FAT/CD36 content and palmitate oxidation are not decreased in obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(6), E1782-1789. doi: 10.1152/ajpendo.00639.2006
- Holmes, J. W., Borg, T. K. et Covell, J. W. (2005). Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng*, 7, 223-253. doi: 10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100453
- Holness, M. J. et Sugden, M. C. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 31(Pt 6), 1143-1151. doi: 10.1042/
- Holst, B., Holliday, N. D., Bach, A., Elling, C. E., Cox, H. M. et Schwartz, T. W. (2004). Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem*, 279(51), 53806-53817. doi: 10.1074/jbc.M407676200
- Holst, B., Lang, M., Brandt, E., Bach, A., Howard, A., Frimurer, T. M., Beck-Sickinger, A. et Schwartz, T. W. (2006). Ghrelin receptor inverse agonists: identification of an active peptide core and its interaction epitopes on the receptor. *Mol Pharmacol*, 70(3), 936-946. doi: 10.1124/mol.106.024422
- Hoosdally, S. J., Andress, E. J., Wooding, C., Martin, C. A. et Linton, K. J. (2009). The Human Scavenger Receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function. *J Biol Chem*, 284(24), 16277-16288. doi: 10.1074/jbc.M109.007849
- Hopkins, P. N. (2013). Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev*, 93(3), 1317-1542. doi: 10.1152/physrev.00004.2012
- Horman, S., Beauloye, C., Vanoverschelde, J. L. et Bertrand, L. (2012). AMP-activated protein kinase in the control of cardiac metabolism and remodeling. *Curr Heart Fail Rep*, 9(3), 164-173. doi: 10.1007/s11897-012-0102-z
- Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H. et Kangawa, K. (2000). Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem*, 275(29), 21995-22000. doi: 10.1074/jbc.M002784200

- Hosoda, H., Kojima, M., Mizushima, T., Shimizu, S. et Kangawa, K. (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*, 278(1), 64-70. doi: 10.1074/jbc.M205366200
- Houten, S. M. et Wanders, R. J. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis*, 33(5), 469-477. doi: 10.1007/s10545-010-9061-2
- Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. F., Arena, J. P., Liberators, P. A., Rosenblum, C. I., Hamelin, M., Hreniuk, D. L., Palyha, O. C., Anderson, J., Paress, P. S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K. K., McKee, K. K., Pong, S. S., Chaung, L. Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D. J., Dean, D. C., Melillo, D. G., Patchett, A. A., Nargund, R., Griffin, P. R., DeMartino, J. A., Gupta, S. K., Schaeffer, J. M., Smith, R. G. et Van der Ploeg, L. H. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*, 273(5277), 974-977.
- Howard, A. D., Wang, R., Pong, S. S., Mellin, T. N., Strack, A., Guan, X. M., Zeng, Z., Williams, D. L., Jr., Feighner, S. D., Nunes, C. N., Murphy, B., Stair, J. N., Yu, H., Jiang, Q., Clements, M. K., Tan, C. P., McKee, K. K., Hreniuk, D. L., McDonald, T. P., Lynch, K. R., Evans, J. F., Austin, C. P., Caskey, C. T., Van der Ploeg, L. H. et Liu, Q. (2000). Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature*, 406(6791), 70-74. doi: 10.1038/35017610
- Hruz, P. W. et Mueckler, M. M. (2001). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol Membr Biol*, 18(3), 183-193.
- Hsieh, F. L., Turner, L., Bolla, J. R., Robinson, C. V., Lavstsen, T. et Higgins, M. K. (2016). The structural basis for CD36 binding by the malaria parasite. *Nat Commun*, 7, 12837. doi: 10.1038/ncomms12837
- Hsieh, J., Longuet, C., Maida, A., Bahrami, J., Xu, E., Baker, C. L., Brubaker, P. L., Drucker, D. J. et Adeli, K. (2009). Glucagon-like peptide-2 increases intestinal lipid absorption and chylomicron production via CD36. *Gastroenterology*, 137(3), 997-1005, 1005 e1001-1004. doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.051
- Hua, W., Huang, H. Z., Tan, L. T., Wan, J. M., Gui, H. B., Zhao, L., Ruan, X. Z., Chen, X. M. et Du, X. G. (2015). CD36 Mediated Fatty Acid-Induced Podocyte Apoptosis via Oxidative Stress. *PLoS One*, 10(5), e0127507. doi: 10.1371/journal.pone.0127507
- Huang, J. T., Welch, J. S., Ricote, M., Binder, C. J., Willson, T. M., Kelly, C., Witztum, J. L., Funk, C. D., Conrad, D. et Glass, C. K. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*, 400(6742), 378-382. doi: 10.1038/22572
- Huang, M. M., Bolen, J. B., Barnwell, J. W., Shattil, S. J. et Brugge, J. S. (1991). Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17), 7844-7848.
- Hue, L. et Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(3), E578-591. doi: 10.1152/ajpendo.00093.2009
- Hughes, J., Liu, Y., Van Damme, J. et Savill, J. (1997). Human glomerular mesangial cell phagocytosis of apoptotic neutrophils: mediation by a novel CD36-independent vitronectin receptor/thrombospondin recognition mechanism that is uncoupled from chemokine secretion. *J Immunol*, 158(9), 4389-4397.

- Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. A., Morgan, B. A. et Morris, H. R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258(5536), 577-580.
- Huynh, D. N., Bessi, V. L., Menard, L., Piquereau, J., Proulx, C., Febbraio, M., Lubell, W. D., Carpentier, A. C., Burelle, Y., Ong, H. et Marleau, S. (2018). Adiponectin has a pivotal role in the cardioprotective effect of CP-3(iv), a selective CD36 azapeptide ligand, after transient coronary artery occlusion in mice. *FASEB J*, 32(2), 807-818. doi: 10.1096/fj.201700505R
- Iacobellis, G., Corradi, D. et Sharma, A. M. (2005). Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2(10), 536-543. doi: 10.1038/ncpcardio0319
- Ibanez, B., Heusch, G., Ovize, M. et Van de Werf, F. (2015). Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*, 65(14), 1454-1471. doi: 10.1016/j.jacc.2015.02.032
- Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A. L. P., Crea, F., Goudevenos, J. A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M. J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimsky, P. et Group, E. S. C. S. D. (2018). 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 39(2), 119-177. doi: 10.1093/eurheartj/ehx393
- Ibrahimi, A., Sfeir, Z., Magharaie, H., Amri, E. Z., Grimaldi, P. et Abumrad, N. A. (1996). Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(7), 2646-2651.
- Iglesias, M. J., Pineiro, R., Blanco, M., Gallego, R., Dieguez, C., Gualillo, O., Gonzalez-Juanatey, J. R. et Lago, F. (2004). Growth hormone-releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 62(3), 481-488. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.01.024
- Inoki, K., Zhu, T. et Guan, K. L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5), 577-590.
- Inserte, J., Barba, I., Hernando, V. et Garcia-Dorado, D. (2009). Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. *Cardiovasc Res*, 81(1), 116-122. doi: 10.1093/cvr/cvn260
- Irie, H., Krukenkamp, I. B., Brinkmann, J. F., Gaudette, G. R., Saltman, A. E., Jou, W., Glatz, J. F., Abumrad, N. A. et Ibrahimi, A. (2003). Myocardial recovery from ischemia is impaired in CD36-null mice and restored by myocyte CD36 expression or medium-chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11), 6819-6824. doi: 10.1073/pnas.1132094100
- Itabe, H., Obama, T. et Kato, R. (2011). The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis. *J Lipids*, 2011, 418313. doi: 10.1155/2011/418313
- Ito, K., Dezaki, K., Yoshida, M., Yamada, H., Miura, R., Rita, R. S., Ookawara, S., Tabei, K., Kawakami, M., Hara, K., Morishita, Y., Yada, T. et Kakei, M. (2017). Endogenous alpha2A-Adrenoceptor-Operated Sympathoadrenergic Tones Attenuate Insulin

- Secretion via cAMP/TRPM2 Signaling. *Diabetes*, 66(3), 699-709. doi: 10.2337/db16-1166
- Iyer, S. S., He, Q., Janczy, J. R., Elliott, E. I., Zhong, Z., Olivier, A. K., Sadler, J. J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S. C., Nauseef, W. M., Cassel, S. L. et Sutterwala, F. S. (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*, 39(2), 311-323. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.001
- Jacob, R. et Kissling, G. (1989). Ventricular pressure-volume relations as the primary basis for evaluation of cardiac mechanics. Return to Frank's diagram. *Basic Res Cardiol*, 84(3), 227-246.
- Jaffe, A. S. et Ordonez-Llanos, J. (2010). High sensitivity troponin in chest pain and acute coronary syndromes. A step forward? *Rev Esp Cardiol*, 63(7), 763-769.
- Jardine, D. L., Charles, C. J., Ashton, R. K., Bennett, S. I., Whitehead, M., Frampton, C. M. et Nicholls, M. G. (2005). Increased cardiac sympathetic nerve activity following acute myocardial infarction in a sheep model. *J Physiol*, 565(Pt 1), 325-333. doi: 10.1113/jphysiol.2004.082198
- Jaswal, J. S., Keung, W., Wang, W., Ussher, J. R. et Lopaschuk, G. D. (2011). Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta*, 1813(7), 1333-1350. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.015
- Jay, A. G., Chen, A. N., Paz, M. A., Hung, J. P. et Hamilton, J. A. (2015). CD36 binds oxidized low density lipoprotein (LDL) in a mechanism dependent upon fatty acid binding. *J Biol Chem*, 290(8), 4590-4603. doi: 10.1074/jbc.M114.627026
- Jeffery, P. L., McGuckin, M. A. et Linden, S. K. (2011). Endocrine impact of Helicobacter pylori: focus on ghrelin and ghrelin o-acyltransferase. *World J Gastroenterol*, 17(10), 1249-1260. doi: 10.3748/wjg.v17.i10.1249
- Jennings, R. B. et Reimer, K. A. (1983). Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation*, 68(2 Pt 2), I25-36.
- Jha, S., Brickey, W. J. et Ting, J. P. (2017). Inflammasomes in Myeloid Cells: Warriors Within. *Microbiol Spectr*, 5(1). doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0049-2016
- Ji, L., Fu, F., Zhang, L., Liu, W., Cai, X., Zhang, L., Zheng, Q., Zhang, H. et Gao, F. (2010). Insulin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via reducing oxidative/nitrative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(4), E871-880. doi: 10.1152/ajpendo.00623.2009
- Jiang, H., Betancourt, L. et Smith, R. G. (2006). Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol*, 20(8), 1772-1785. doi: 10.1210/me.2005-0084
- Jimenez-Dalmaroni, M. J., Xiao, N., Corper, A. L., Verdino, P., Ainge, G. D., Larsen, D. S., Painter, G. F., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Hoebe, K., Beutler, B. et Wilson, I. A. (2009). Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PLoS One*, 4(10), e7411. doi: 10.1371/journal.pone.0007411
- Jocken, J. W. et Blaak, E. E. (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol Behav*, 94(2), 219-230. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.01.002
- Johns, T. N. et Olson, B. J. (1954). Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*, 140(5), 675-682.

- Johnson, J. L. (2007). Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 5(2), 265-282. doi: 10.1586/14779072.5.2.265
- Jossart, C., Mulumba, M., Granata, R., Gallo, D., Ghigo, E., Marleau, S., Servant, M. J. et Ong, H. (2014). Pyroglutamylated RF-amide peptide (QRFP) gene is regulated by metabolic endotoxemia. *Mol Endocrinol*, 28(1), 65-79. doi: 10.1210/me.2013-1027
- Julian, F. J. et Sollins, M. R. (1975). Sarcomere length-tension relations in living rat papillary muscle. *Circ Res*, 37(3), 299-308.
- Julien, M., Kay, R. G., Delhanty, P. J., Allas, S., Granata, R., Barton, C., Constable, S., Ghigo, E., van der Lely, A. J. et Abribat, T. (2012). In vitro and in vivo stability and pharmacokinetic profile of unacylated ghrelin (UAG) analogues. *Eur J Pharm Sci*, 47(4), 625-635. doi: 10.1016/j.ejps.2012.07.014
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. et Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 298, 229-317. doi: 10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. et Oikawa, S. (2004). Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul Pept*, 119(1-2), 77-81. doi: 10.1016/j.regpep.2004.01.012
- Kamp, F., Guo, W., Souto, R., Pilch, P. F., Corkey, B. E. et Hamilton, J. A. (2003). Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. *J Biol Chem*, 278(10), 7988-7995. doi: 10.1074/jbc.M206648200
- Kamp, F. et Hamilton, J. A. (1992). pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(23), 11367-11370.
- Kanaan, G. N. et Harper, M. E. (2017). Cellular redox dysfunction in the development of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1861(11 Pt A), 2822-2829. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.07.027
- Kanamoto, N., Akamizu, T., Hosoda, H., Hataya, Y., Ariyasu, H., Takaya, K., Hosoda, K., Saijo, M., Moriyama, K., Shimatsu, A., Kojima, M., Kangawa, K. et Nakao, K. (2001). Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(10), 4984-4990. doi: 10.1210/jcem.86.10.7891
- Kar, N. S., Ashraf, M. Z., Valiyaveetil, M. et Podrez, E. A. (2008). Mapping and characterization of the binding site for specific oxidized phospholipids and oxidized low density lipoprotein of scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*, 283(13), 8765-8771. doi: 10.1074/jbc.M709195200
- Kashiwagi, H., Tomiyama, Y., Kosugi, S., Shiraga, M., Lipsky, R. H., Nagao, N., Kanakura, Y., Kurata, Y. et Matsuzawa, Y. (1995). Family studies of type II CD36 deficient subjects: linkage of a CD36 allele to a platelet-specific mRNA expression defect(s) causing type II CD36 deficiency. *Thromb Haemost*, 74(2), 758-763.
- Kawczynska-Drozd, A., Olszanecki, R., Jawien, J., Brzozowski, T., Pawlik, W. W., Korbut, R. et Guzik, T. J. (2006). Ghrelin inhibits vascular superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 19(7), 764-767. doi: 10.1016/j.amjhyper.2006.01.022
- Kaye, D. M., Lefkovits, J., Jennings, G. L., Bergin, P., Broughton, A. et Esler, M. D. (1995). Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol*, 26(5), 1257-1263. doi: 10.1016/0735-1097(95)00332-0

- Kellner-Weibel, G. et de la Llera-Moya, M. (2011). Update on HDL receptors and cellular cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep*, 13(3), 233-241. doi: 10.1007/s11883-011-0169-0
- Kennedy, D. J., Kuchibhotla, S., Westfall, K. M., Silverstein, R. L., Morton, R. E. et Febbraio, M. (2011). A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res*, 89(3), 604-613. doi: 10.1093/cvr/cvq360
- Kerkhoff, C., Sorg, C., Tandon, N. N. et Nacken, W. (2001). Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells. *Biochemistry*, 40(1), 241-248.
- Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H. E. et Smith, R. G. (2012). Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron*, 73(2), 317-332. doi: 10.1016/j.neuron.2011.10.038
- Kim, A. S., Miller, E. J., Wright, T. M., Li, J., Qi, D., Atsina, K., Zaha, V., Sakamoto, K. et Young, L. H. (2011). A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 51(1), 24-32. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.03.003
- Kim, C., Xuong, N. H. et Taylor, S. S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science*, 307(5710), 690-696. doi: 10.1126/science.1104607
- Kim, S. W., Her, S. J., Park, S. J., Kim, D., Park, K. S., Lee, H. K., Han, B. H., Kim, M. S., Shin, C. S. et Kim, S. Y. (2005). Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone*, 37(3), 359-369. doi: 10.1016/j.bone.2005.04.020
- Kim, T. T. et Dyck, J. R. (2016). The role of CD36 in the regulation of myocardial lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1861(10), 1450-1460. doi: 10.1016/j.bbali.2016.03.018
- King, K. L., Stanley, W. C., Rosca, M., Kerner, J., Hoppel, C. L. et Febbraio, M. (2007). Fatty acid oxidation in cardiac and skeletal muscle mitochondria is unaffected by deletion of CD36. *Arch Biochem Biophys*, 467(2), 234-238. doi: 10.1016/j.abb.2007.08.020
- Kintaka, T., Tanaka, T., Imai, M., Adachi, I., Narabayashi, I. et Kitaura, Y. (2002). CD36 genotype and long-chain fatty acid uptake in the heart. *Circ J*, 66(9), 819-825.
- Kirk, J. A. et Cingolani, O. H. (2016). Thrombospondins in the transition from myocardial infarction to heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 90, 102-110. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.009
- Kleinbongard, P., Schulz, R. et Heusch, G. (2011). TNFalpha in myocardial ischemia/reperfusion, remodeling and heart failure. *Heart Fail Rev*, 16(1), 49-69. doi: 10.1007/s10741-010-9180-8
- Kleinz, M. J., Maguire, J. J., Skepper, J. N. et Davenport, A. P. (2006). Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc Res*, 69(1), 227-235. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.09.001
- Klenotic, P. A., Page, R. C., Li, W., Amick, J., Misra, S. et Silverstein, R. L. (2013). Molecular basis of antiangiogenic thrombospondin-1 type 1 repeat domain interactions with CD36. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(7), 1655-1662. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301523

- Knudtson, J. (1984). Adrenergic effects on plasma levels of glucagon, insulin, glucose and free fatty acids in rabbits--influences of selective blocking drugs. *Acta Physiol Scand*, 120(3), 353-361. doi: 10.1111/j.1748-1716.1984.tb07395.x
- Kojima, M., Haruno, R., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Hanada, R., Matsuo, H. et Kangawa, K. (2000). Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem Biophys Res Commun*, 276(2), 435-438. doi: 10.1006/bbrc.2000.3502
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. et Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762), 656-660. doi: 10.1038/45230
- Kojima, M. et Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*, 85(2), 495-522. doi: 10.1152/physrev.00012.2004
- Kojima, M. et Kangawa, K. (2008). Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ*, 46, 89-115. doi: 10.1007/400\_2007\_049
- Komura, N., Kihara, S., Sonoda, M., Kumada, M., Fujita, K., Hiuge, A., Okada, T., Nakagawa, Y., Tamba, S., Kuroda, Y., Hayashi, N., Sumitsuji, S., Kawamoto, T., Matsumoto, S., Ouchi, N., Arita, Y., Okamoto, Y., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. et Osaka, C. A. D. G. (2008). Clinical significance of high-molecular weight form of adiponectin in male patients with coronary artery disease. *Circ J*, 72(1), 23-28.
- Koppen, A. et Kalkhoven, E. (2010). Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story. *FEBS Lett*, 584(15), 3250-3259. doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.035
- Korbonits, M., Bustin, S. A., Kojima, M., Jordan, S., Adams, E. F., Lowe, D. G., Kangawa, K. et Grossman, A. B. (2001). The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(2), 881-887. doi: 10.1210/jcem.86.2.7190
- Korbonits, M., Kojima, M., Kangawa, K. et Grossman, A. B. (2001). Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine*, 14(1), 101-104. doi: 10.1385/ENDO:14:1:101
- Kos, K., Harte, A. L., O'Hare, P. J., Kumar, S. et McTernan, P. G. (2009). Ghrelin and the differential regulation of des-acyl (DSG) and oct-anoyl ghrelin (OTG) in human adipose tissue (AT). *Clin Endocrinol (Oxf)*, 70(3), 383-389. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03321.x
- Kovacic, S., Soltys, C. L., Barr, A. J., Shiojima, I., Walsh, K. et Dyck, J. R. (2003). Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. *J Biol Chem*, 278(41), 39422-39427. doi: 10.1074/jbc.M305371200
- Krijnen, P. A., Sipkens, J. A., Molling, J. W., Rauwerda, J. A., Stehouwer, C. D., Muller, A., Paulus, W. J., van Nieuw Amerongen, G. P., Hack, C. E., Verhoeven, A. J., van Hinsbergh, V. W. et Niessen, H. W. (2010). Inhibition of Rho-ROCK signaling induces apoptotic and non-apoptotic PS exposure in cardiomyocytes via inhibition of flippase. *J Mol Cell Cardiol*, 49(5), 781-790. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.07.017
- Kruth, H. S. (1984). Localization of unesterified cholesterol in human atherosclerotic lesions. Demonstration of filipin-positive, oil-red-O-negative particles. *Am J Pathol*, 114(2), 201-208.
- Kuang, M., Febbraio, M., Wagg, C., Lopaschuk, G. D. et Dyck, J. R. (2004). Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts

- before or after ischemia. *Circulation*, 109(12), 1550-1557. doi: 10.1161/01.CIR.0000121730.41801.12
- Kuchibhotla, S., Vanegas, D., Kennedy, D. J., Guy, E., Nimako, G., Morton, R. E. et Febbraio, M. (2008). Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res*, 78(1), 185-196. doi: 10.1093/cvr/cvm093
- Kuda, O., Pietka, T. A., Demianova, Z., Kudova, E., Cvacka, J., Kopecky, J. et Abumrad, N. A. (2013). Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J Biol Chem*, 288(22), 15547-15555. doi: 10.1074/jbc.M113.473298
- Kudo, N., Barr, A. J., Barr, R. L., Desai, S. et Lopaschuk, G. D. (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, 270(29), 17513-17520.
- Kumada, M., Kihara, S., Ouchi, N., Kobayashi, H., Okamoto, Y., Ohashi, K., Maeda, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Maeda, N., Nagasawa, A., Funahashi, T. et Matsuzawa, Y. (2004). Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*, 109(17), 2046-2049. doi: 10.1161/01.CIR.0000127953.98131.ED
- Kumada, M., Kihara, S., Sumitsuji, S., Kawamoto, T., Matsumoto, S., Ouchi, N., Arita, Y., Okamoto, Y., Shimomura, I., Hiraoka, H., Nakamura, T., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. et Osaka, C. A. D. S. G. C. a. d. (2003). Association of hypo adiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(1), 85-89.
- Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F. et Freeman, M. W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*, 277(51), 49982-49988. doi: 10.1074/jbc.M209649200
- Kurien, V. A. et Oliver, M. F. (1971). Free fatty acids during acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis*, 13(4), 361-373.
- Kvietys, P. R. et Granger, D. N. (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med*, 52(3), 556-592. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.002
- Labovitz, A. J., Lewen, M. K., Kern, M., Vandormael, M., Deligonal, U. et Kennedy, H. L. (1987). Evaluation of left ventricular systolic and diastolic dysfunction during transient myocardial ischemia produced by angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 10(4), 748-755.
- Lacerda, L., Somers, S., Opie, L. H. et Lecour, S. (2009). Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res*, 84(2), 201-208. doi: 10.1093/cvr/cvp274
- Lambe, K. G. et Tugwood, J. D. (1996). A human peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidinedione drugs. *Eur J Biochem*, 239(1), 1-7.
- Larhlimi, A., Basler, G., Grimbs, S., Selbig, J. et Nikoloski, Z. (2012). Stoichiometric capacitance reveals the theoretical capabilities of metabolic networks. *Bioinformatics*, 28(18), i502-i508. doi: 10.1093/bioinformatics/bts381

- Lau, W. B., Ohashi, K., Wang, Y., Ogawa, H., Murohara, T., Ma, X. L. et Ouchi, N. (2017). Role of Adipokines in Cardiovascular Disease. *Circ J*, 81(7), 920-928. doi: 10.1253/circj.CJ-17-0458
- Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J. P. et Besnard, P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest*, 115(11), 3177-3184. doi: 10.1172/JCI25299
- Laviano, A., Molino, A., Rianda, S. et Rossi Fanelli, F. (2012). The growth hormone secretagogue receptor (Ghs-R). *Curr Pharm Des*, 18(31), 4749-4754.
- Le Foll, C., Irani, B. G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A. A. et Levin, B. E. (2009). Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 297(3), R655-664. doi: 10.1152/ajpregu.00223.2009
- Lear, P. V., Iglesias, M. J., Feijoo-Bandin, S., Rodriguez-Penas, D., Mosquera-Leal, A., Garcia-Rua, V., Gualillo, O., Ghe, C., Arnoletti, E., Muccioli, G., Dieguez, C., Gonzalez-Juanatey, J. R. et Lago, F. (2010). Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology*, 151(7), 3286-3298. doi: 10.1210/en.2009-1205
- Lecour, S. (2009). Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol*, 47(1), 32-40. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.03.019
- Lee, J. Y., Jung, G. Y., Heo, H. J., Yun, M. R., Park, J. Y., Bae, S. S., Hong, K. W., Lee, W. S. et Kim, C. D. (2006). 4-Hydroxynonenal induces vascular smooth muscle cell apoptosis through mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Toxicol Lett*, 166(3), 212-221. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.07.305
- Lee, M. S., Park, H. S., Lee, B. C., Jung, J. H., Yoo, J. S. et Kim, S. E. (2016). Identification of Angiogenesis Rich-Viable Myocardium using RGD Dimer based SPECT after Myocardial Infarction. *Sci Rep*, 6, 27520. doi: 10.1038/srep27520
- Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M. et Kliewer, S. A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, 270(22), 12953-12956.
- Leitinger, N. (2003). Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 14(5), 421-430. doi: 10.1097/01.mol.0000092616.86399.dc
- Lepretre, F., Linton, K. J., Lacquemant, C., Vatin, V., Samson, C., Dina, C., Chikri, M., Ali, S., Scherer, P., Seron, K., Vasseur, F., Aitman, T. et Froguel, P. (2004). Genetic study of the CD36 gene in a French diabetic population. *Diabetes Metab*, 30(5), 459-463.
- Lesnefsky, E. J., Chen, Q., Tandler, B. et Hoppel, C. L. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Myocardial Ischemia-Reperfusion: Implications for Novel Therapies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 57, 535-565. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103335
- Leung, L. L., Li, W. X., McGregor, J. L., Albrecht, G. et Howard, R. J. (1992). CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction. *J Biol Chem*, 267(25), 18244-18250.
- Leung, P. K., Chow, K. B., Lau, P. N., Chu, K. M., Chan, C. B., Cheng, C. H. et Wise, H. (2007). The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative

- mutant of the ghrelin receptor. *Cell Signal*, 19(5), 1011-1022. doi: 10.1016/j.cellsig.2006.11.011
- Li, H., Yao, W., Irwin, M. G., Wang, T., Wang, S., Zhang, L. et Xia, Z. (2015). Adiponectin ameliorates hyperglycemia-induced cardiac hypertrophy and dysfunction by concomitantly activating Nrf2 and Brg1. *Free Radic Biol Med*, 84, 311-321. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.007
- Li, L., Zhang, L. K., Pang, Y. Z., Pan, C. S., Qi, Y. F., Chen, L., Wang, X., Tang, C. S. et Zhang, J. (2006). Cardioprotective effects of ghrelin and des-octanoyl ghrelin on myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 27(5), 527-535. doi: 10.1111/j.1745-7254.2006.00319.x
- Liao, R., Podesser, B. K. et Lim, C. C. (2012). The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(2), H156-167. doi: 10.1152/ajpheart.00333.2012
- Libby, P. (2000). Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*, 247(3), 349-358.
- Libby, P. (2013). Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*, 368(21), 2004-2013. doi: 10.1056/NEJMra1216063
- Libby, P., Nahrendorf, M. et Swirski, F. K. (2013). Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol*, 35(5), 553-562. doi: 10.1007/s00281-013-0387-3
- Lim, C. T., Kola, B. et Korbonits, M. (2011). The ghrelin/GOAT/GHS-R system and energy metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*, 12(3), 173-186. doi: 10.1007/s11154-011-9169-1
- Lim, S. Y. et Hausenloy, D. J. (2012). Remote ischemic conditioning: from bench to bedside. *Front Physiol*, 3, 27. doi: 10.3389/fphys.2012.00027
- Lin, L., Saha, P. K., Ma, X., Henshaw, I. O., Shao, L., Chang, B. H., Buras, E. D., Tong, Q., Chan, L., McGuinness, O. P. et Sun, Y. (2011). Ablation of ghrelin receptor reduces adiposity and improves insulin sensitivity during aging by regulating fat metabolism in white and brown adipose tissues. *Aging Cell*, 10(6), 996-1010. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00740.x
- Lindsey, M. L., Bolli, R., Canty, J. M., Jr., Du, X. J., Frangogiannis, N. G., Frantz, S., Gourdie, R. G., Holmes, J. W., Jones, S. P., Kloner, R. A., Lefter, D. J., Liao, R., Murphy, E., Ping, P., Przyklenk, K., Recchia, F. A., Schwartz Longacre, L., Ripplinger, C. M., Van Eyk, J. E. et Heusch, G. (2018). Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 314(4), H812-H838. doi: 10.1152/ajpheart.00335.2017
- Lindsey, M. L., Kassiri, Z., Virag, J. A. I., de Castro Bras, L. E. et Scherrer-Crosbie, M. (2018). Guidelines for measuring cardiac physiology in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 314(4), H733-H752. doi: 10.1152/ajpheart.00339.2017
- Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jerome, W. G. J., Linton, E. F. et Vickers, K. C. (2000). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. Dans L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer & A. Vinik (dir.), *Endotext*. South Dartmouth (MA).
- Lionetti, V., Stanley, W. C. et Recchia, F. A. (2011). Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc Res*, 90(2), 202-209. doi: 10.1093/cvr/cvr038

- Liu, B., Garcia, E. A. et Korbonits, M. (2011). Genetic studies on the ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and ghrelin O-acyl transferase (GOAT) genes. *Peptides*, 32(11), 2191-2207. doi: 10.1016/j.peptides.2011.09.006
- Liu, G., Fortin, J. P., Beinborn, M. et Kopin, A. S. (2007). Four missense mutations in the ghrelin receptor result in distinct pharmacological abnormalities. *J Pharmacol Exp Ther*, 322(3), 1036-1043. doi: 10.1124/jpet.107.123141
- Liu, J., Guo, M., Zhang, D., Cheng, S. Y., Liu, M., Ding, J., Scherer, P. E., Liu, F. et Lu, X. Y. (2012). Adiponectin is critical in determining susceptibility to depressive behaviors and has antidepressant-like activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(30), 12248-12253. doi: 10.1073/pnas.1202835109
- Liu, J., Sukhova, G. K., Sun, J. S., Xu, W. H., Libby, P. et Shi, G. P. (2004). Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(8), 1359-1366. doi: 10.1161/01.ATV.0000134530.27208.41
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D. et Sun, S. C. (2017). NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23
- Liu, Y., Chewchuk, S., Lavigne, C., Brule, S., Pilon, G., Houde, V., Xu, A., Marette, A. et Sweeney, G. (2009). Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(3), E657-664. doi: 10.1152/ajpendo.00186.2009
- Liu, Y., Neumann, D., Glatz, J. F. et Luiken, J. J. (2016). Molecular mechanism of lipid-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. doi: 10.1016/j.plefa.2016.06.002
- Liu, Y., Steinbusch, L. K. M., Nabben, M., Kapsokalyvas, D., van Zandvoort, M., Schonleitner, P., Antoons, G., Simons, P. J., Coumans, W. A., Geomini, A., Chanda, D., Glatz, J. F. C., Neumann, D. et Luiken, J. (2017). Palmitate-Induced Vacuolar-Type H(+)-ATPase Inhibition Feeds Forward Into Insulin Resistance and Contractile Dysfunction. *Diabetes*, 66(6), 1521-1534. doi: 10.2337/db16-0727
- Liu, Y., Yang, H., Song, L., Li, N., Han, Q. Y., Tian, C., Gao, E., Du, J., Xia, Y. L. et Li, H. H. (2014). AGGF1 protects from myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating myocardial apoptosis and angiogenesis. *Apoptosis*, 19(8), 1254-1268. doi: 10.1007/s10495-014-1001-4
- Lobo, M. V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., de la Cueva, P., Celdran, A., Martin-Hidalgo, A., Vega, M. A. et Bragado, R. (2001). Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem*, 49(10), 1253-1260. doi: 10.1177/002215540104901007
- Locatelli, V., Rossoni, G., Schweiger, F., Torsello, A., De Gennaro Colonna, V., Bernareggi, M., Deghenghi, R., Muller, E. E. et Berti, F. (1999). Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology*, 140(9), 4024-4031. doi: 10.1210/endo.140.9.6948
- Longo, K. A., Charoenthongtrakul, S., Giuliana, D. J., Govek, E. K., McDonagh, T., Qi, Y., DiStefano, P. S. et Geddes, B. J. (2008). Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regul Pept*, 150(1-3), 55-61. doi: 10.1016/j.regpep.2008.03.011

- Lopaschuk, G. D. (2017). Metabolic Modulators in Heart Disease: Past, Present, and Future. *Can J Cardiol*, 33(7), 838-849. doi: 10.1016/j.cjca.2016.12.013
- Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D., Jaswal, J. S. et Stanley, W. C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 90(1), 207-258. doi: 10.1152/physrev.00015.2009
- Lopez-Dee, Z., Pidcock, K. et Gutierrez, L. S. (2011). Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation. *Mediators Inflamm*, 2011, 296069. doi: 10.1155/2011/296069
- Loubele, S. T., Spek, C. A., Leenders, P., van Oerle, R., Aberson, H. L., van der Voort, D., Hamulyak, K., Petersen, L. C., Spronk, H. M. et ten Cate, H. (2009). Active site inhibited factor VIIa attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Thromb Haemost*, 7(2), 290-298. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03232.x
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Szmítko, P. E., Singh, K. K., Shukla, P. C., Gupta, M., Chan, L., Al-Omran, M., Teoh, H. et Verma, S. (2010). Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299(3), H656-663. doi: 10.1152/ajpheart.00115.2010
- Lu, X. et Kakkar, V. (2014). Inflammasome and atherogenesis. *Curr Pharm Des*, 20(1), 108-124.
- Luiken, J. J., Arumugam, Y., Bell, R. C., Calles-Escandon, J., Tandon, N. N., Glatz, J. F. et Bonen, A. (2002). Changes in fatty acid transport and transporters are related to the severity of insulin deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283(3), E612-621. doi: 10.1152/ajpendo.00011.2002
- Luiken, J. J., Arumugam, Y., Dyck, D. J., Bell, R. C., Pelsers, M. M., Turcotte, L. P., Tandon, N. N., Glatz, J. F. et Bonen, A. (2001). Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. *J Biol Chem*, 276(44), 40567-40573. doi: 10.1074/jbc.M100052200
- Luiken, J. J., Chanda, D., Nabben, M., Neumann, D. et Glatz, J. F. (2016). Post-translational modifications of CD36 (SR-B2): Implications for regulation of myocellular fatty acid uptake. *Biochim Biophys Acta*, 1862(12), 2253-2258. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.09.004
- Luiken, J. J., Coort, S. L., Koonen, D. P., van der Horst, D. J., Bonen, A., Zorzano, A. et Glatz, J. F. (2004). Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Arch*, 448(1), 1-15. doi: 10.1007/s00424-003-1199-4
- Luiken, J. J., Glatz, J. F. et Neumann, D. (2015). Cardiac contraction-induced GLUT4 translocation requires dual signaling input. *Trends Endocrinol Metab*, 26(8), 404-410. doi: 10.1016/j.tem.2015.06.002
- Luiken, J. J., Koonen, D. P., Willems, J., Zorzano, A., Becker, C., Fischer, Y., Tandon, N. N., Van Der Vusse, G. J., Bonen, A. et Glatz, J. F. (2002). Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes*, 51(10), 3113-3119.
- Luiken, J. J., Niessen, H. E., Coort, S. L., Hoebbers, N., Coumans, W. A., Schwenk, R. W., Bonen, A. et Glatz, J. F. (2009). Etomoxir-induced partial carnitine palmitoyltransferase-I (CPT-I) inhibition in vivo does not alter cardiac long-chain fatty acid uptake and oxidation rates. *Biochem J*, 419(2), 447-455. doi: 10.1042/BJ20082159
- Luiken, J. J., Schaap, F. G., van Nieuwenhoven, F. A., van der Vusse, G. J., Bonen, A. et Glatz, J. F. (1999). Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids*, 34 Suppl, S169-175.

- Luiken, J. J., Turcotte, L. P. et Bonen, A. (1999). Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *J Lipid Res*, 40(6), 1007-1016.
- Luiken, J. J., Willems, J., Coort, S. L., Coumans, W. A., Bonen, A., Van Der Vusse, G. J. et Glatz, J. F. (2002). Effects of cAMP modulators on long-chain fatty-acid uptake and utilization by electrically stimulated rat cardiac myocytes. *Biochem J*, 367(Pt 3), 881-887. doi: 10.1042/BJ20020432
- Lundby, A., Lage, K., Weinert, B. T., Bekker-Jensen, D. B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C. D., Dmytriiev, A., Choudhary, C., Lundby, C. et Olsen, J. V. (2012). Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns. *Cell Rep*, 2(2), 419-431. doi: 10.1016/j.celrep.2012.07.006
- Luo, Y., Duan, H., Qian, Y., Feng, L., Wu, Z., Wang, F., Feng, J., Yang, D., Qin, Z. et Yan, X. (2017). Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention during atherosclerosis. *Cell Res*, 27(3), 352-372. doi: 10.1038/cr.2017.8
- Luque, R. M., Kineman, R. D., Park, S., Peng, X. D., Gracia-Navarro, F., Castano, J. P. et Malagon, M. M. (2004). Homologous and heterologous regulation of pituitary receptors for ghrelin and growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology*, 145(7), 3182-3189. doi: 10.1210/en.2003-1626
- Luscher, T. F., Dohi, Y., Tanner, F. C. et Boulanger, C. (1991). Endothelium-dependent control of vascular tone: effects of age, hypertension and lipids. *Basic Res Cardiol*, 86 Suppl 2, 143-158.
- Luscinskas, F. W. et Gimbrone, M. A., Jr. (1996). Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med*, 47, 413-421. doi: 10.1146/annurev.med.47.1.413
- Lushchak, O. V., Piroddi, M., Galli, F. et Lushchak, V. I. (2014). Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species. *Redox Rep*, 19(1), 8-15. doi: 10.1179/1351000213Y.0000000073
- Lynes, M., Narisawa, S., Millan, J. L. et Widmaier, E. P. (2011). Interactions between CD36 and global intestinal alkaline phosphatase in mouse small intestine and effects of high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301(6), R1738-1747. doi: 10.1152/ajpregu.00235.2011
- Ma, M. W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K. M., Vadlamudi, R. K. et Brann, D. W. (2017). NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol Neurodegener*, 12(1), 7. doi: 10.1186/s13024-017-0150-7
- Ma, X., Bacci, S., Mlynarski, W., Gottardo, L., Soccio, T., Menzaghi, C., Iori, E., Lager, R. A., Shroff, A. R., Gervino, E. V., Nesto, R. W., Johnstone, M. T., Abumrad, N. A., Avogaro, A., Trischitta, V. et Doria, A. (2004). A common haplotype at the CD36 locus is associated with high free fatty acid levels and increased cardiovascular risk in Caucasians. *Hum Mol Genet*, 13(19), 2197-2205. doi: 10.1093/hmg/ddh233
- Ma, Y., Liu, Y., Liu, S., Qu, Y., Wang, R., Xia, C., Pei, H., Lian, K., Yin, T., Lu, X., Sun, L., Yang, L., Cao, Y., Lau, W. B., Gao, E., Wang, H. et Tao, L. (2011). Dynamic alteration of adiponectin/adiponectin receptor expression and its impact on myocardial ischemia/reperfusion in type 1 diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301(3), E447-455. doi: 10.1152/ajpendo.00687.2010

- Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Iyer, R. P., Cannon, P. L., Flynn, E. R., Jung, M., Henry, J., Cates, C. A., Deleon-Pennell, K. Y. et Lindsey, M. L. (2016). Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, *110*(1), 51-61. doi: 10.1093/cvr/cvw024
- MacLennan, N. K., Rahib, L., Shin, C., Fang, Z., Horvath, S., Dean, J., Liao, J. C., McCabe, E. R. et Dipple, K. M. (2006). Targeted disruption of glycerol kinase gene in mice: expression analysis in liver shows alterations in network partners related to glycerol kinase activity. *Hum Mol Genet*, *15*(3), 405-415. doi: 10.1093/hmg/ddi457
- Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T., Kihara, S., Nishizawa, H., Kishida, K., Nagaretani, H., Matsuda, M., Komuro, R., Ouchi, N., Kuriyama, H., Hotta, K., Nakamura, T., Shimomura, I. et Matsuzawa, Y. (2001). PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, *50*(9), 2094-2099.
- Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R. B. et Hay, N. (2004). Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol Cell Biol*, *24*(2), 730-740.
- Mansbach, C. M., 2nd et Siddiqi, S. (2016). Control of chylomicron export from the intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *310*(9), G659-668. doi: 10.1152/ajpgi.00228.2015
- Mao, Y., Tokudome, T. et Kishimoto, I. (2014). The cardiovascular action of hexarelin. *J Geriatr Cardiol*, *11*(3), 253-258. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2014.03.007
- Mao, Y., Tokudome, T., Kishimoto, I., Otani, K., Miyazato, M. et Kangawa, K. (2014). One dose of oral hexarelin protects chronic cardiac function after myocardial infarction. *Peptides*, *56*, 156-162. doi: 10.1016/j.peptides.2014.04.004
- Mao, Y., Tokudome, T., Otani, K., Kishimoto, I., Nakanishi, M., Hosoda, H., Miyazato, M. et Kangawa, K. (2012). Ghrelin prevents incidence of malignant arrhythmia after acute myocardial infarction through vagal afferent nerves. *Endocrinology*, *153*(7), 3426-3434. doi: 10.1210/en.2012-1065
- Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A. et Brasaemle, D. L. (2006). The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem*, *281*(17), 11901-11909. doi: 10.1074/jbc.M600171200
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M. et Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, *440*(7081), 228-232. doi: 10.1038/nature04515
- Marleau, S., Harb, D., Bujold, K., Avallone, R., Iken, K., Wang, Y., Demers, A., Sirois, M. G., Febbraio, M., Silverstein, R. L., Tremblay, A. et Ong, H. (2005). EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J*, *19*(13), 1869-1871. doi: 10.1096/fj.04-3253fje
- Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D. et Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol*, *10*(20), 1247-1255.
- Martin, C., Chevrot, M., Poirier, H., Passilly-Degrace, P., Niot, I. et Besnard, P. (2011). CD36 as a lipid sensor. *Physiol Behav*, *105*(1), 36-42. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.02.029

- Martin, C., Passilly-Degrace, P., Gaillard, D., Merlin, J. F., Chevrot, M. et Besnard, P. (2011). The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS One*, 6(8), e24014. doi: 10.1371/journal.pone.0024014
- Martini, A. C., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Navarro, V. M., Vigo, E., Vazquez, M. J., Davies, J. S., Thompson, N. M., Aguilar, E., Pinilla, L., Wells, T., Dieguez, C. et Tena-Sempere, M. (2006). Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology*, 147(5), 2374-2382. doi: 10.1210/en.2005-1422
- Masuda, D., Hirano, K., Oku, H., Sandoval, J. C., Kawase, R., Yuasa-Kawase, M., Yamashita, Y., Takada, M., Tsubakio-Yamamoto, K., Tochino, Y., Koseki, M., Matsuura, F., Nishida, M., Kawamoto, T., Ishigami, M., Hori, M., Shimomura, I. et Yamashita, S. (2009). Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency. *J Lipid Res*, 50(5), 999-1011. doi: 10.1194/jlr.P700032-JLR200
- Matsushima, S., Kuroda, J., Ago, T., Zhai, P., Ikeda, Y., Oka, S., Fong, G. H., Tian, R. et Sadoshima, J. (2013). Broad suppression of NADPH oxidase activity exacerbates ischemia/reperfusion injury through inadvertent downregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Circ Res*, 112(8), 1135-1149. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300171
- Matsushima, S., Tsutsui, H. et Sadoshima, J. (2014). Physiological and pathological functions of NADPH oxidases during myocardial ischemia-reperfusion. *Trends Cardiovasc Med*, 24(5), 202-205. doi: 10.1016/j.tcm.2014.03.003
- Maulik, N. et Das, D. K. (2002). Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med*, 33(8), 1047-1060.
- Maynard, J. A., Lindquist, N. C., Sutherland, J. N., Lesuffleur, A., Warrington, A. E., Rodriguez, M. et Oh, S. H. (2009). Surface plasmon resonance for high-throughput ligand screening of membrane-bound proteins. *Biotechnol J*, 4(11), 1542-1558. doi: 10.1002/biot.200900195
- Mayoral, R., Osborn, O., McNelis, J., Johnson, A. M., Oh, D. Y., Izquierdo, C. L., Chung, H., Li, P., Traves, P. G., Bandyopadhyay, G., Pessentheiner, A. R., Ofrecio, J. M., Cook, J. R., Qiang, L., Accili, D. et Olefsky, J. M. (2015). Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPARgamma activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity. *Mol Metab*, 4(5), 378-391. doi: 10.1016/j.molmet.2015.02.007
- McCormick, G. F., Millard, W. J., Badger, T. M., Bowers, C. Y. et Martin, J. B. (1985). Dose-response characteristics of various peptides with growth hormone-releasing activity in the unanesthetized male rat. *Endocrinology*, 117(1), 97-105. doi: 10.1210/endo-117-1-97
- McDonald, H., Peart, J., Kurniawan, N., Galloway, G., Royce, S., Samuel, C. S. et Chen, C. (2018). Hexarelin treatment preserves myocardial function and reduces cardiac fibrosis in a mouse model of acute myocardial infarction. *Physiol Rep*, 6(9), e13699. doi: 10.14814/phy2.13699
- Memon, R. A., Fuller, J., Moser, A. H., Smith, P. J., Grunfeld, C. et Feingold, K. R. (1999). Regulation of putative fatty acid transporters and Acyl-CoA synthetase in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Diabetes*, 48(1), 121-127.

- Mercer, J. G., Moar, K. M., Rayner, D. V., Trayhurn, P. et Hoggard, N. (1997). Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold-exposed lean mice. *FEBS Lett*, 402(2-3), 185-188.
- Mersmann, J., Latsch, K., Habeck, K. et Zacharowski, K. (2011). Measure for measure-determination of infarct size in murine models of myocardial ischemia and reperfusion: a systematic review. *Shock*, 35(5), 449-455. doi: 10.1097/SHK.0b013e318208af64
- Michael, L. H., Entman, M. L., Hartley, C. J., Youker, K. A., Zhu, J., Hall, S. R., Hawkins, H. K., Berens, K. et Ballantyne, C. M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*, 269(6 Pt 2), H2147-2154. doi: 10.1152/ajpheart.1995.269.6.H2147
- Micheau, O., Shirley, S. et Dufour, F. (2013). Death receptors as targets in cancer. *Br J Pharmacol*, 169(8), 1723-1744. doi: 10.1111/bph.12238
- Miegeue, P., St Pierre, D., Broglio, F. et Cianflone, K. (2011). Effect of desacyl ghrelin, obestatin and related peptides on triglyceride storage, metabolism and GHSR signaling in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem*, 112(2), 704-714. doi: 10.1002/jcb.22983
- Miller, E. J., Li, J., Leng, L., McDonald, C., Atsumi, T., Bucala, R. et Young, L. H. (2008). Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature*, 451(7178), 578-582. doi: 10.1038/nature06504
- Minor, L. K., Rothblat, G. H. et Glick, J. M. (1989). Triglyceride and cholesteryl ester hydrolysis in a cell culture model of smooth muscle foam cells. *J Lipid Res*, 30(2), 189-197.
- Minutoli, L., Puzzolo, D., Rinaldi, M., Irrera, N., Marini, H., Arcoraci, V., Bitto, A., Crea, G., Pisani, A., Squadrito, F., Trichilo, V., Bruschetta, D., Micali, A. et Altavilla, D. (2016). ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2183026. doi: 10.1155/2016/2183026
- Miquilena-Colina, M. E., Lima-Cabello, E., Sanchez-Campos, S., Garcia-Mediavilla, M. V., Fernandez-Bermejo, M., Lozano-Rodriguez, T., Vargas-Castrillon, J., Buque, X., Ochoa, B., Aspichueta, P., Gonzalez-Gallego, J. et Garcia-Monzon, C. (2011). Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*, 60(10), 1394-1402. doi: 10.1136/gut.2010.222844
- Mitry, M. A. et Edwards, J. G. (2016). Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 10, 17-24. doi: 10.1016/j.ijcha.2015.11.004
- Miyamoto, S., Howes, A. L., Adams, J. W., Dorn, G. W., 2nd et Brown, J. H. (2005). Ca<sup>2+</sup> dysregulation induces mitochondrial depolarization and apoptosis: role of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and AKT. *J Biol Chem*, 280(46), 38505-38512. doi: 10.1074/jbc.M505223200
- Miyamoto, S., Rubio, M. et Sussman, M. A. (2009). Nuclear and mitochondrial signalling Akts in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 82(2), 272-285. doi: 10.1093/cvr/cvp087
- Miyoshi, T., Li, Y., Shih, D. M., Wang, X., Laubach, V. E., Matsumoto, A. H., Helm, G. A., Lusis, A. J. et Shi, W. (2006). Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci*, 79(6), 525-531. doi: 10.1016/j.lfs.2006.01.043

- Mocanu, M. M., Bell, R. M. et Yellon, D. M. (2002). PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 34(6), 661-668. doi: 10.1006/jmcc.2002.2006
- Mokrosinski, J. et Holst, B. (2010). Modulation of the constitutive activity of the ghrelin receptor by use of pharmacological tools and mutagenesis. *Methods Enzymol*, 484, 53-73. doi: 10.1016/B978-0-12-381298-8.00003-4
- Molloy, C. J., Taylor, D. S. et Pawlowski, J. E. (1999). Novel cardiovascular actions of the activins. *J Endocrinol*, 161(2), 179-185.
- Momany, F. A., Bowers, C. Y., Reynolds, G. A., Chang, D., Hong, A. et Newlander, K. (1981). Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro. *Endocrinology*, 108(1), 31-39. doi: 10.1210/endo-108-1-31
- Momany, F. A., Bowers, C. Y., Reynolds, G. A., Hong, A. et Newlander, K. (1984). Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology*, 114(5), 1531-1536. doi: 10.1210/endo-114-5-1531
- Monti, V., Carlson, J.J., Hunt, S.C. et Adams, T.D. (2006) Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults. *J Am Diet Assoc*, 106(6), 822-8; quiz 829-30. DOI: 10.1016/j.jada.2006.03.015
- Moore, K. J., El Khoury, J., Medeiros, L. A., Terada, K., Geula, C., Luster, A. D. et Freeman, M. W. (2002). A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem*, 277(49), 47373-47379. doi: 10.1074/jbc.M208788200
- Moore, K. J. et Freeman, M. W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(8), 1702-1711. doi: 10.1161/01.ATV.0000229218.97976.43
- Morciano, G., Bonora, M., Campo, G., Aquila, G., Rizzo, P., Giorgi, C., Wieckowski, M. R. et Pinton, P. (2017). Mechanistic Role of mPTP in Ischemia-Reperfusion Injury. *Adv Exp Med Biol*, 982, 169-189. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6\_9
- Morgan, M. J. et Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 21(1), 103-115. doi: 10.1038/cr.2010.178
- Mori, K., Yoshimoto, A., Takaya, K., Hosoda, K., Ariyasu, H., Yahata, K., Mukoyama, M., Sugawara, A., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K. et Nakao, K. (2000). Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett*, 486(3), 213-216.
- Morisco, C., Marrone, C., Trimarco, V., Crispo, S., Monti, M. G., Sadoshima, J. et Trimarco, B. (2007). Insulin resistance affects the cytoprotective effect of insulin in cardiomyocytes through an impairment of MAPK phosphatase-1 expression. *Cardiovasc Res*, 76(3), 453-464. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.07.012
- Motayagheni, N. (2017). Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: Improved heart quality and decreased risk of ischemia. *MethodsX*, 4, 508-512. doi: 10.1016/j.mex.2017.11.004
- Muccioli, G., Papotti, M., Locatelli, V., Ghigo, E. et Deghenghi, R. (2001). Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *J Endocrinol Invest*, 24(3), RC7-9.
- Muccioli, G., Pons, N., Ghe, C., Catapano, F., Granata, R. et Ghigo, E. (2004). Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol*, 498(1-3), 27-35. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.066

- Muller, F. L., Liu, Y. et Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, 279(47), 49064-49073. doi: 10.1074/jbc.M407715200
- Müller, T.D., Müller, A., Yi, C., Habegger K.M., Meyer, C.W., Gaylinn, B.D., Finan, B., Heppner, K., Trivedi, C., Bielohuby, M., Abplanalp, W., Meyer, F., Piechowski, C.L., Pratzka, J., Stemmer, K., Holland, J., Hembree, J., Bhardwaj, N., Raver, C., Ottaway, N., Krishna, R., Sah, R., Sallee, F.R., Woods, S.C., Perez-Tilve, D., Bidlingmaier, M., Thorner, M.O., Krude, H., Smiley, D., DiMarchi, R., Hofmann, S., Pfluger, P.T., Kleinau, G., Biebermann, H. et Tschöpa, M.H. (2013) Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept*, pii: 945056. doi: 10.1155/2010/945056
- Muller, T. D., Nogueiras, R., Andermann, M. L., Andrews, Z. B., Anker, S. D., Argente, J., Batterham, R. L., Benoit, S. C., Bowers, C. Y., Broglio, F., Casanueva, F. F., D'Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter, A., Ghigo, E., Cole, P. A., Cowley, M., Cummings, D. E., Dagher, A., Diano, S., Dickson, S. L., Dieguez, C., Granata, R., Grill, H. J., Grove, K., Habegger, K. M., Heppner, K., Heiman, M. L., Holsen, L., Holst, B., Inui, A., Jansson, J. O., Kirchner, H., Korbonits, M., Laferrere, B., LeRoux, C. W., Lopez, M., Morin, S., Nakazato, M., Nass, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P. T., Schwartz, T. W., Seeley, R. J., Sleeman, M., Sun, Y., Sussel, L., Tong, J., Thorner, M. O., van der Lely, A. J., van der Ploeg, L. H., Zigman, J. M., Kojima, M., Kangawa, K., Smith, R. G., Horvath, T. et Tschop, M. H. (2015). Ghrelin. *Mol Metab*, 4(6), 437-460. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005
- Muller, W. A. (2013). Getting leukocytes to the site of inflammation. *Vet Pathol*, 50(1), 7-22. doi: 10.1177/0300985812469883
- Mulumba, M., Granata, R., Marleau, S. et Ong, H. (2015). QRFP-43 inhibits lipolysis by preventing ligand-induced complex formation between perilipin A, caveolin-1, the catalytic subunit of protein kinase and hormone-sensitive lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1851(5), 657-666. doi: 10.1016/j.bbalip.2015.02.005
- Mulumba, M., Jossart, C., Granata, R., Gallo, D., Escher, E., Ghigo, E., Servant, M. J., Marleau, S. et Ong, H. (2010). GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis. *Mol Endocrinol*, 24(8), 1615-1625. doi: 10.1210/me.2010-0010
- Munday, M. R. (2002). Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*, 30(Pt 6), 1059-1064. doi: 10.1042/
- Murphy, E. et Steenbergen, C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*, 88(2), 581-609. doi: 10.1152/physrev.00024.2007
- Murry, C. E., Jennings, R. B. et Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136.
- Muthuramu, I., Lox, M., Jacobs, F. et De Geest, B. (2014). Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure. *J Vis Exp*(94). doi: 10.3791/52206
- Mwaikambo, B. R., Yang, C., Chemtob, S. et Hardy, P. (2009). Hypoxia up-regulates CD36 expression and function via hypoxia-inducible factor-1- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms. *J Biol Chem*, 284(39), 26695-26707. doi: 10.1074/jbc.M109.033480
- Nachlas, M. M. et Shnitka, T. K. (1963). Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Am J Pathol*, 42, 379-405.

- Nahrendorf, M., Pittet, M. J. et Swirski, F. K. (2010). Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*, *121*(22), 2437-2445. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346
- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R. et Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, *204*(12), 3037-3047. doi: 10.1084/jem.20070885
- Nassir, F., Wilson, B., Han, X., Gross, R. W. et Abumrad, N. A. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem*, *282*(27), 19493-19501. doi: 10.1074/jbc.M703330200
- Nauli, A. M., Nassir, F., Zheng, S., Yang, Q., Lo, C. M., Vonlehmden, S. B., Lee, D., Jandacek, R. J., Abumrad, N. A. et Tso, P. (2006). CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology*, *131*(4), 1197-1207. doi: 10.1053/j.gastro.2006.08.012
- Neculai, D., Schwake, M., Ravichandran, M., Zunke, F., Collins, R. F., Peters, J., Neculai, M., Plumb, J., Loppnau, P., Pizarro, J. C., Seitova, A., Trimble, W. S., Saftig, P., Grinstein, S. et Dhe-Paganon, S. (2013). Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. *Nature*, *504*(7478), 172-176. doi: 10.1038/nature12684
- Neels, J. G. et Grimaldi, P. A. (2014). Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Physiol Rev*, *94*(3), 795-858. doi: 10.1152/physrev.00027.2013
- Nerem, R. M., Levesque, M. J. et Cornhill, J. F. (1981). Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J Biomech Eng*, *103*(3), 172-176.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med*, *356*(11), 1140-1151. doi: 10.1056/NEJMra063052
- Nicholson, A. C., Febbraio, M., Han, J., Silverstein, R. L. et Hajjar, D. P. (2000). CD36 in atherosclerosis. The role of a class B macrophage scavenger receptor. *Ann N Y Acad Sci*, *902*, 128-131; discussion 131-123.
- Nickerson, J. G., Alkhatieb, H., Benton, C. R., Lally, J., Nickerson, J., Han, X. X., Wilson, M. H., Jain, S. S., Snook, L. A., Glatz, J. F., Chabowski, A., Luiken, J. J. et Bonen, A. (2009). Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, *284*(24), 16522-16530. doi: 10.1074/jbc.M109.004788
- Nicotera, P. et Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, *23*(16), 2757-2765. doi: 10.1038/sj.onc.1207559
- Niot, I. et Besnard, P. (2017). Appetite control by the tongue-gut axis and evaluation of the role of CD36/SR-B2. *Biochimie*, *136*, 27-32. doi: 10.1016/j.biochi.2017.02.011
- Nishi, Y., Yoh, J., Hiejima, H. et Kojima, M. (2011). Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides. *Peptides*, *32*(11), 2175-2182. doi: 10.1016/j.peptides.2011.07.024
- Nozaki, S., Kashiwagi, H., Yamashita, S., Nakagawa, T., Kostner, B., Tomiyama, Y., Nakata, A., Ishigami, M., Miyagawa, J., Kameda-Takemura, K. et et al. (1995). Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest*, *96*(4), 1859-1865. doi: 10.1172/JCI118231

- Nozaki, S., Tanaka, T., Yamashita, S., Sohmiya, K., Yoshizumi, T., Okamoto, F., Kitaura, Y., Kotake, C., Nishida, H., Nakata, A., Nakagawa, T., Matsumoto, K., Kameda-Takemura, K., Tadokoro, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y., Kawamura, K. et Matsuzawa, Y. (1999). CD36 mediates long-chain fatty acid transport in human myocardium: complete myocardial accumulation defect of radiolabeled long-chain fatty acid analog in subjects with CD36 deficiency. *Mol Cell Biochem*, 192(1-2), 129-135.
- O'Neill, L. A. (2009). Regulation of signaling by non-degradative ubiquitination. *J Biol Chem*, 284(13), 8209. doi: 10.1074/jbc.R800070200
- Obinata, H. et Izumi, T. (2009). G2A as a receptor for oxidized free fatty acids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89(3-4), 66-72. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2008.11.002
- Ohashi, K., Parker, J. L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J. A., Gokce, N., Pedersen, A. A., Kalthoff, C., Tullin, S., Sams, A., Summer, R. et Walsh, K. (2010). Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem*, 285(9), 6153-6160. doi: 10.1074/jbc.M109.088708
- Ohgami, N., Nagai, R., Ikemoto, M., Arai, H., Kuniyasu, A., Horiuchi, S. et Nakayama, H. (2001). CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci*, 947, 350-355.
- Olagnier, D., Lavergne, R. A., Meunier, E., Lefevre, L., Dardenne, C., Aubouy, A., Benoit-Vical, F., Ryffel, B., Coste, A., Berry, A. et Pipy, B. (2011). Nrf2, a PPARgamma alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog*, 7(9), e1002254. doi: 10.1371/journal.ppat.1002254
- Olejnickova, V., Novakova, M. et Provaznik, I. (2015). Isolated heart models: cardiovascular system studies and technological advances. *Med Biol Eng Comput*, 53(7), 669-678. doi: 10.1007/s11517-015-1270-2
- Onay-Besikci, A., Campbell, F. M., Hopkins, T. A., Dyck, J. R. et Lopaschuk, G. D. (2003). Relative importance of malonyl CoA and carnitine in maturation of fatty acid oxidation in newborn rabbit heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(1), H283-289. doi: 10.1152/ajpheart.00461.2002
- Ong, H., Bodart, V., McNicoll, N., Lamontagne, D. et Bouchard, J. F. (1998). Binding sites for growth hormone-releasing peptide. *Growth Horm IGF Res*, 8 Suppl B, 137-140.
- Ong, H., McNicoll, N., Escher, E., Collu, R., Deghenghi, R., Locatelli, V., Ghigo, E., Muccioli, G., Boghen, M. et Nilsson, M. (1998). Identification of a pituitary growth hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling. *Endocrinology*, 139(1), 432-435. doi: 10.1210/endo.139.1.5811
- Ong, H., Chemtob, S., Lubell, W., Senlaub, F., Boeglin, D., Proulx, C., Sajjadi, Z. et Sabatino, D. (2013) U.S. Patent No. US8435954(B2). Recherché dans Google Patents.
- Ong, S. B., Dongworth, R. K., Cabrera-Fuentes, H. A. et Hausenloy, D. J. (2015). Role of the MPTP in conditioning the heart - translatability and mechanism. *Br J Pharmacol*, 172(8), 2074-2084. doi: 10.1111/bph.13013
- Ooi, B. K., Goh, B. H. et Yap, W. H. (2017). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Involvement of Nrf2 Antioxidant Redox Signaling in Macrophage Foam Cells Formation. *Int J Mol Sci*, 18(11). doi: 10.3390/ijms18112336
- Ortiz-Masia, D., Diez, I., Calatayud, S., Hernandez, C., Cosin-Roger, J., Hinojosa, J., Esplugues, J. V. et Barrachina, M. D. (2012). Induction of CD36 and thrombospondin-1 in

- macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *PLoS One*, 7(10), e48535. doi: 10.1371/journal.pone.0048535
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Hotta, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Yamashita, S., Funahashi, T. et Matsuzawa, Y. (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*, 103(8), 1057-1063.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. et Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11(2), 85-97. doi: 10.1038/nri2921
- Ouwens, D. M., Sell, H., Greulich, S. et Eckel, J. (2010). The role of epicardial and perivascular adipose tissue in the pathophysiology of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med*, 14(9), 2223-2234. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01141.x
- Overduin, J., Frayo, R. S., Grill, H. J., Kaplan, J. M. et Cummings, D. E. (2005). Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology*, 146(2), 845-850. doi: 10.1210/en.2004-0609
- Ovrevik, J., Refsnes, M., Lag, M., Holme, J. A. et Schwarze, P. E. (2015). Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules*, 5(3), 1399-1440. doi: 10.3390/biom5031399
- Oyama, J., Blais, C., Jr., Liu, X., Pu, M., Kobzik, L., Kelly, R. A. et Bourcier, T. (2004). Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*, 109(6), 784-789. doi: 10.1161/01.CIR.0000112575.66565.84
- Ozcan, B., Leenen, P. J. M., Delhanty, P. J. D., Baldeon-Rojas, L. Y., Neggers, S. J. et van der Lely, A. J. (2017). Unacylated ghrelin modulates circulating angiogenic cell number in insulin-resistant states. *Diabetol Metab Syndr*, 9, 43. doi: 10.1186/s13098-017-0239-8
- Pap, M. et Cooper, G. M. (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*, 273(32), 19929-19932.
- Papotti, M., Ghe, C., Cassoni, P., Catapano, F., Deghenghi, R., Ghigo, E. et Muccioli, G. (2000). Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(10), 3803-3807. doi: 10.1210/jcem.85.10.6846
- Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J. Y., Strassheim, D., Ishizaka, A. et Abraham, E. (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*, 279(9), 7370-7377. doi: 10.1074/jbc.M306793200
- Park, J. Y., Kim, M. J., Kim, Y. K. et Woo, J. S. (2011). Ceramide induces apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathways in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Arch Toxicol*, 85(9), 1057-1065. doi: 10.1007/s00204-011-0645-x
- Park, S., Jiang, H., Zhang, H. et Smith, R. G. (2012). Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(46), 19003-19008. doi: 10.1073/pnas.1209590109
- Park, S., Yoon, S. J., Tae, H. J. et Shim, C. Y. (2011). RAGE and cardiovascular disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 486-497.
- Park, S. K., Oh, S. Y., Lee, M. Y., Yoon, S., Kim, K. S. et Kim, J. W. (2004). CCAAT/enhancer binding protein and nuclear factor-Y regulate adiponectin gene expression in adipose tissue. *Diabetes*, 53(11), 2757-2766.

- Park, S. S., Zhao, H., Jang, Y., Mueller, R. A. et Xu, Z. (2006). N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methylcarboxamide confers cardioprotection at reperfusion by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening via glycogen synthase kinase 3 beta. *J Pharmacol Exp Ther*, 318(1), 124-131. doi: 10.1124/jpet.106.101477
- Park, Y. M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med*, 46, e99. doi: 10.1038/emm.2014.38
- Patchett, A. A., Nargund, R. P., Tata, J. R., Chen, M. H., Barakat, K. J., Johnston, D. B., Cheng, K., Chan, W. W., Butler, B., Hickey, G. et al. (1995). Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(15), 7001-7005.
- Patterson, M., Murphy, K. G., le Roux, C. W., Ghatei, M. A. et Bloom, S. R. (2005). Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(4), 2205-2211. doi: 10.1210/jc.2004-1641
- Pawlinski, R. et Mackman, N. (2009). Tissue factor and heart inflammation. *J Thromb Haemost*, 7(2), 288-289. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03257.x
- Pei, X. M., Yung, B. Y., Yip, S. P., Chan, L. W., Wong, C. S., Ying, M. et Siu, P. M. (2015). Protective effects of desacyl ghrelin on diabetic cardiomyopathy. *Acta Diabetol*, 52(2), 293-306. doi: 10.1007/s00592-014-0637-4
- Pei, X. M., Yung, B. Y., Yip, S. P., Ying, M., Benzie, I. F. et Siu, P. M. (2014). Desacyl ghrelin prevents doxorubicin-induced myocardial fibrosis and apoptosis via the GHSR-independent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306(3), E311-323. doi: 10.1152/ajpendo.00123.2013
- Peled, M. et Fisher, E. A. (2014). Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression. *Front Immunol*, 5, 579. doi: 10.3389/fimmu.2014.00579
- Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D. et Abumrad, N. A. (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr*, 34, 281-303. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161220
- Perez-Tilve, D., Heppner, K., Kirchner, H., Lockie, S. H., Woods, S. C., Smiley, D. L., Tschop, M. et Pfluger, P. (2011). Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. *FASEB J*, 25(8), 2814-2822. doi: 10.1096/fj.11-183632
- Picard, E., Houssier, M., Bujold, K., Sapiéha, P., Lubell, W., Dorfman, A., Racine, J., Hardy, P., Febbraio, M., Lachapelle, P., Ong, H., Sennlaub, F. et Chemtob, S. (2010). CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits. *Aging (Albany NY)*, 2(12), 981-989. doi: 10.18632/aging.100218
- Pineiro, R., Iglesias, M. J., Gallego, R., Raghay, K., Eiras, S., Rubio, J., Dieguez, C., Gualillo, O., Gonzalez-Juanatey, J. R. et Lago, F. (2005). Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett*, 579(23), 5163-5169. doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.098
- Piper H. M. et Preusse C. J. (212) Ischemia-Reperfusion in Cardiac Surgery. *Developments in Cardiovascular Medicine*, Volume 142, 67-78. ISBN 9401117136, 9789401117135.
- Pischon, T., Girman, C. J., Hotamisligil, G. S., Rifai, N., Hu, F. B. et Rimm, E. B. (2004). Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*, 291(14), 1730-1737. doi: 10.1001/jama.291.14.1730
- Pistner, A., Belmonte, S., Coulthard, T. et Blaxall, B. (2010). Murine echocardiography and ultrasound imaging. *J Vis Exp*(42). doi: 10.3791/2100

- Podrez, E. A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R. L., Hajjar, D. P., Cohen, P. A., Frazier, W. A., Hoff, H. F. et Hazen, S. L. (2000). Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest*, 105(8), 1095-1108. doi: 10.1172/JCI8574
- Podrez, E. A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P. J., Shan, L., Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L., Hoff, H. F., Salomon, R. G. et Hazen, S. L. (2002). A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem*, 277(41), 38517-38523. doi: 10.1074/jbc.M205924200
- Pohl, J., Ring, A., Korkmaz, U., Eehalt, R. et Stremmel, W. (2005). FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Mol Biol Cell*, 16(1), 24-31. doi: 10.1091/mbc.e04-07-0616
- Poirier, H., Degrace, P., Niot, I., Bernard, A. et Besnard, P. (1996). Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem*, 238(2), 368-373.
- Porporato, P. E., Filigheddu, N., Reano, S., Ferrara, M., Angelino, E., Gnocchi, V. F., Prodam, F., Ronchi, G., Fagoonee, S., Fornaro, M., Chianale, F., Baldanzi, G., Surico, N., Sinigaglia, F., Perroteau, I., Smith, R. G., Sun, Y., Geuna, S. et Graziani, A. (2013). Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice. *J Clin Invest*, 123(2), 611-622. doi: 10.1172/JCI39920
- Postic, C., Leturque, A., Printz, R. L., Maulard, P., Loizeau, M., Granner, D. K. et Girard, J. (1994). Development and regulation of glucose transporter and hexokinase expression in rat. *Am J Physiol*, 266(4 Pt 1), E548-559. doi: 10.1152/ajpendo.1994.266.4.E548
- Poulos, A. (1995). Very long chain fatty acids in higher animals--a review. *Lipids*, 30(1), 1-14.
- Prabhu, S. D. et Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119(1), 91-112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577
- Prabhudas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., Febbraio, M., Herz, J., Kobzik, L., Krieger, M., Loike, J., Means, T. K., Moestrup, S. K., Post, S., Sawamura, T., Silverstein, S., Wang, X. Y. et El Khoury, J. (2014). Standardizing scavenger receptor nomenclature. *J Immunol*, 192(5), 1997-2006. doi: 10.4049/jimmunol.1490003
- Proulx, C., Picard, E., Boeglin, D., Pohankova, P., Chemtob, S., Ong, H. et Lubell, W. D. (2012). Azapeptide analogues of the growth hormone-releasing peptide 6 as cluster of differentiation 36 receptor ligands with reduced affinity for the growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem*, 55(14), 6502-6511. doi: 10.1021/jm300557t
- Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A. et Whittaker, P. (1993). Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87(3), 893-899.
- Puente Navazo, M. D., Daviet, L., Ninio, E. et McGregor, J. L. (1996). Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(8), 1033-1039.
- Qi, D. et Young, L. H. (2015). AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab*, 26(8), 422-429. doi: 10.1016/j.tem.2015.05.010
- Qiao, L. et Shao, J. (2006). SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem*, 281(52), 39915-39924. doi: 10.1074/jbc.M607215200

- Qiao, L., Zou, C., Shao, P., Schaack, J., Johnson, P. F. et Shao, J. (2008). Transcriptional regulation of fatty acid translocase/CD36 expression by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem*, 283(14), 8788-8795. doi: 10.1074/jbc.M800055200
- Quillard, T., Araujo, H. A., Franck, G., Tesmenitsky, Y. et Libby, P. (2014). Matrix metalloproteinase-13 predominates over matrix metalloproteinase-8 as the functional interstitial collagenase in mouse atheromata. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34(6), 1179-1186. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303326
- Rac, M. E., Safranow, K. et Poncyljusz, W. (2007). Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med*, 13(5-6), 288-296. doi: 10.2119/2006-00088.Raac
- Raedschelders, K., Ansley, D. M. et Chen, D. D. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*, 133(2), 230-255. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.11.004
- Rahaman, S. O., Lennon, D. J., Febbraio, M., Podrez, E. A., Hazen, S. L. et Silverstein, R. L. (2006). A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab*, 4(3), 211-221. doi: 10.1016/j.cmet.2006.06.007
- Rahaman, S. O., Li, W. et Silverstein, R. L. (2013). Vav Guanine nucleotide exchange factors regulate atherosclerotic lesion development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(9), 2053-2057. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301414
- Rahimi, K., Duncan, M., Pitcher, A., Emdin, C. A. et Goldacre, M. J. (2015). Mortality from heart failure, acute myocardial infarction and other ischaemic heart disease in England and Oxford: a trend study of multiple-cause-coded death certification. *J Epidemiol Community Health*, 69(10), 1000-1005. doi: 10.1136/jech-2015-205689
- Rahko, P. S. (1994). Comparative efficacy of three indexes of left ventricular performance derived from pressure-volume loops in heart failure induced by tachypacing. *J Am Coll Cardiol*, 23(1), 209-218.
- Raines, E. W. (2004). PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(4), 237-254. doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.004
- Randle, P. J. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev*, 14(4), 263-283.
- Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. et Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1(7285), 785-789.
- Ratnayake, W. M. et Galli, C. (2009). Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann Nutr Metab*, 55(1-3), 8-43. doi: 10.1159/000228994
- Rediger, A., Piechowski, C.L., Yi, C.X., Tarnow, P., Strotmann, R., Grüters, A., Krude, H., Schöneberg, T., Tschöp, M.H., Kleinau et G., Biebermann, H. (2011) Mutually opposite signal modulation by hypothalamic heterodimerization of ghrelin and melanocortin-3 receptors. *J Biol Chem* 286(45), 39623-39631. doi: 10.1074/jbc.M111.287607
- Reimer, K. A., Lowe, J. E., Rasmussen, M. M. et Jennings, R. B. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*, 56(5), 786-794.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S., Galano, A., Zhou, X. J. et Xu, B. (2018). Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules*, 23(2). doi: 10.3390/molecules23020509

- Ren, Y., Li, Y., Yan, J., Ma, M., Zhou, D., Xue, Z., Zhang, Z., Liu, H., Yang, H., Jia, L., Zhang, L., Zhang, Q., Mu, S., Zhang, R. et Da, Y. (2017). Adiponectin modulates oxidative stress-induced mitophagy and protects C2C12 myoblasts against apoptosis. *Sci Rep*, 7(1), 3209. doi: 10.1038/s41598-017-03319-2
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M. et Hanson, R. W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem*, 278(33), 30413-30416. doi: 10.1074/jbc.R300017200
- Reszko, A. E., Kasumov, T., David, F., Thomas, K. R., Jobbins, K. A., Cheng, J. F., Lopaschuk, G. D., Dyck, J. R., Diaz, M., Des Rosiers, C., Stanley, W. C. et Brunengraber, H. (2004). Regulation of malonyl-CoA concentration and turnover in the normal heart. *J Biol Chem*, 279(33), 34298-34301. doi: 10.1074/jbc.M405488200
- Rhodes, L., Zollers, B., Wofford, J. A. et Heinen, E. (2018). Capromorelin: a ghrelin receptor agonist and novel therapy for stimulation of appetite in dogs. *Vet Med Sci*, 4(1), 3-16. doi: 10.1002/vms3.83
- Ricchiuti, V., Voss, E. M., Ney, A., Odland, M., Anderson, P. A. et Apple, F. S. (1998). Cardiac troponin T isoforms expressed in renal diseased skeletal muscle will not cause false-positive results by the second generation cardiac troponin T assay by Boehringer Mannheim. *Clin Chem*, 44(9), 1919-1924.
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P. et Stremmel, W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1761(4), 416-423. doi: 10.1016/j.bbailip.2006.03.016
- Rivier, J., Spiess, J., Thorner, M. et Vale, W. (1982). Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature*, 300(5889), 276-278.
- Roberts, W., Magwenzi, S., Aburima, A. et Naseem, K. M. (2010). Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade. *Blood*, 116(20), 4297-4306. doi: 10.1182/blood-2010-01-265561
- Rodrigue-Way, A., Demers, A., Ong, H. et Tremblay, A. (2007). A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology*, 148(3), 1009-1018. doi: 10.1210/en.2006-0975
- Rodrigues, S. F. et Granger, D. N. (2010). Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res*, 87(2), 291-299. doi: 10.1093/cvr/cvq090
- Rodriguez, A., Gomez-Ambrosi, J., Catalan, V., Becerril, S., Sainz, N., Ramirez, B., Salvador, J., Diez, J., Fortuno, A. et Fruhbeck, G. (2008). Vasodilator effect of ghrelin in the rat aorta. *Endocrinol Nutr*, 55(10), 448-453. doi: 10.1016/S1575-0922(08)75841-8
- Rodriguez, A., Gomez-Ambrosi, J., Catalan, V., Gil, M. J., Becerril, S., Sainz, N., Silva, C., Salvador, J., Colina, I. et Fruhbeck, G. (2009). Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond)*, 33(5), 541-552. doi: 10.1038/ijo.2009.40
- Rodríguez, A., Gómez-Ambrosi, J., Catalán, V., Rotellar, F., Valentí, V., Silva, C., Mugueta, C., Pulido, M.R., Vázquez, R., Salvador, J., Malagón, M.M., Colina, I. et Frühbeck, G. The ghrelin O-acyltransferase-ghrelin system reduces TNF- $\alpha$ -induced apoptosis and autophagy in human visceral adipocytes. *Diabetologia*, 55(11), 3038-50. doi: 10.1007/s00125-012-2671-5

- Roelants, V., Delgaudine, M., Walrand, S., Lhommel, R., Beguin, Y., Jamar, F. et Vanoverschelde, J. L. (2012). Myocardial infarct size quantification in mice by SPECT using a novel algorithm independent of a normal perfusion database. *EJNMMI Res*, 2(1), 64. doi: 10.1186/2191-219X-2-64
- Rolin, J. et Maghazachi, A. A. (2014). Implications of chemokines, chemokine receptors, and inflammatory lipids in atherosclerosis. *J Leukoc Biol*, 95(4), 575-585. doi: 10.1189/jlb.1113571
- Rossoni, G., De Gennaro Colonna, V., Bernareggi, M., Polvani, G. L., Muller, E. E. et Berti, F. (1998). Protectant activity of hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 32(2), 260-265.
- Roth, D. M., Swaney, J. S., Dalton, N. D., Gilpin, E. A. et Ross, J., Jr. (2002). Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(6), H2134-2140. doi: 10.1152/ajpheart.00845.2001
- Roumi, M., Marleau, S., du Souich, P., Maggi, T., Deghenghi, R. et Ong, H. (2000). Kinetics and disposition of hexarelin, a peptidic growth hormone secretagogue, in rats. *Drug Metab Dispos*, 28(1), 44-50.
- Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Miro-Casas, E., Abellan, A. et Soler-Soler, J. (2006). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during simulated ischemia does not affect permeability transition pore opening upon simulated reperfusion. *Cardiovasc Res*, 71(4), 715-724. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.06.019
- Ruozi, G., Bortolotti, F., Falcione, A., Dal Ferro, M., Ukovich, L., Macedo, A., Zentilin, L., Filigheddu, N., Gortan Cappellari, G., Baldini, G., Zweyer, M., Barazzoni, R., Graziani, A., Zacchigna, S. et Giacca, M. (2015). AAV-mediated in vivo functional selection of tissue-protective factors against ischaemia. *Nat Commun*, 6, 7388. doi: 10.1038/ncomms8388
- Russell, R. R., 3rd, Li, J., Coven, D. L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., Giordano, F. J., Mu, J., Birnbaum, M. J. et Young, L. H. (2004). AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest*, 114(4), 495-503. doi: 10.1172/JCI19297
- Rutkowski, J. M., Stern, J. H. et Scherer, P. E. (2015). The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*, 208(5), 501-512. doi: 10.1083/jcb.201409063
- Ryeom, S. W., Sparrow, J. R. et Silverstein, R. L. (1996). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci*, 109 (Pt 2), 387-395.
- Sabatino, D., Proulx, C., Pohankova, P., Ong, H. et Lubell, W. D. (2011). Structure-activity relationships of GHRP-6 azapeptide ligands of the CD36 scavenger receptor by solid-phase submonomer azapeptide synthesis. *J Am Chem Soc*, 133(32), 12493-12506. doi: 10.1021/ja203007u
- Saddik, M., Gamble, J., Witters, L. A. et Lopaschuk, G. D. (1993). Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J Biol Chem*, 268(34), 25836-25845.
- Saeed, M., Hetts, S. W., Do, L. et Wilson, M. W. (2013). Assessment of microembolization associated with revascularization in acute myocardial infarction: MDCT cardiac perfusion and function study. *Int J Cardiovasc Imaging*, 29(8), 1861-1869. doi: 10.1007/s10554-013-0273-z
- Sagawa, K. (1978). The ventricular pressure-volume diagram revisited. *Circ Res*, 43(5), 677-687.

- Sakata, I., Nakamura, K., Yamazaki, M., Matsubara, M., Hayashi, Y., Kangawa, K. et Sakai, T. (2002). Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides*, 23(3), 531-536.
- Salto-Tellez, M., Yung Lim, S., El-Oakley, R. M., Tang, T. P., ZA, A. L. et Lim, S. K. (2004). Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol*, 13(2), 91-97. doi: 10.1016/S1054-8807(03)00129-7
- Salvado, M. D., Alfranca, A., Escolano, A., Haeggstrom, J. Z. et Redondo, J. M. (2009). COX-2 limits prostanoid production in activated HUVECs and is a source of PGH2 for transcellular metabolism to PGE2 by tumor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(7), 1131-1137. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.188540
- Sambandam, N., Abrahani, M. A., St Pierre, E., Al-Atar, O., Cam, M. C. et Rodrigues, B. (1999). Localization of lipoprotein lipase in the diabetic heart: regulation by acute changes in insulin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(6), 1526-1534.
- Samovski, D., Sun, J., Pietka, T., Gross, R. W., Eckel, R. H., Su, X., Stahl, P. D. et Abumrad, N. A. (2015). Regulation of AMPK activation by CD36 links fatty acid uptake to beta-oxidation. *Diabetes*, 64(2), 353-359. doi: 10.2337/db14-0582
- Sanada, S., Komuro, I. et Kitakaze, M. (2011). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(5), H1723-1741. doi: 10.1152/ajpheart.00553.2011
- Sanmarco, L. M., Eberhardt, N., Ponce, N. E., Cano, R. C., Bonacci, G. et Aoki, M. P. (2017). New Insights into the Immunobiology of Mononuclear Phagocytic Cells and Their Relevance to the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Front Immunol*, 8, 1921. doi: 10.3389/fimmu.2017.01921
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*, 283(5407), 1488-1493.
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Mollgard, K. et Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front Neurosci*, 9, 385. doi: 10.3389/fnins.2015.00385
- Savill, J., Hogg, N., Ren, Y. et Haslett, C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*, 90(4), 1513-1522. doi: 10.1172/JCI116019
- Schaper, W., Gorge, G., Winkler, B. et Schaper, J. (1988). The collateral circulation of the heart. *Prog Cardiovasc Dis*, 31(1), 57-77.
- Schellekens, H., De Francesco, P. N., Kandil, D., Theeuwes, W. F., McCarthy, T., van Oeffelen, W. E., Perello, M., Giblin, L., Dinan, T. G. et Cryan, J. F. (2015). Ghrelin's Orexigenic Effect Is Modulated via a Serotonin 2C Receptor Interaction. *ACS Chem Neurosci*, 6(7), 1186-1197. doi: 10.1021/cn500318q
- Schenk, S. et Horowitz, J. F. (2006). Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291(2), E254-260. doi: 10.1152/ajpendo.00051.2006
- Schluter, K. D., Schulz, R. et Schreckenber, R. (2015). Arginase induction and activation during ischemia and reperfusion and functional consequences for the heart. *Front Physiol*, 6, 65. doi: 10.3389/fphys.2015.00065

- Schneider, F., Sukhova, G. K., Aikawa, M., Canner, J., Gerdes, N., Tang, S. M., Shi, G. P., Apte, S. S. et Libby, P. (2008). Matrix-metalloproteinase-14 deficiency in bone-marrow-derived cells promotes collagen accumulation in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation*, 117(7), 931-939. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.707448
- Schneider, H., Schubert, K. M., Blodow, S., Kreutz, C. P., Erdogmus, S., Wiedenmann, M., Qiu, J., Fey, T., Ruth, P., Lubomirov, L. T., Pfitzer, G., Mederos, Y. S. M., Hardie, D. G., Gudermann, T. et Pohl, U. (2015). AMPK Dilates Resistance Arteries via Activation of SERCA and BKCa Channels in Smooth Muscle. *Hypertension*, 66(1), 108-116. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05514
- Schneider, H., Staudacher, S., Poppelreuther, M., Stremmel, W., Eehalt, R. et Fullekrug, J. (2014). Protein mediated fatty acid uptake: synergy between CD36/FAT-facilitated transport and acyl-CoA synthetase-driven metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 546, 8-18. doi: 10.1016/j.abb.2014.01.025
- Schonfeld, P. et Wojtczak, L. (2016). Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J Lipid Res*, 57(6), 943-954. doi: 10.1194/jlr.R067629
- Schwartz, S. M. (1999). The intima : A new soil. *Circ Res*, 85(10), 877-879.
- Schwartz, T. W., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M. et Elling, C. E. (2006). Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 481-519. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141218
- Schwenk, R. W., Dirx, E., Coumans, W. A., Bonen, A., Klip, A., Glatz, J. F. et Luiken, J. J. (2010). Requirement for distinct vesicle-associated membrane proteins in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced translocation of GLUT4 and CD36 in cultured cardiomyocytes. *Diabetologia*, 53(10), 2209-2219. doi: 10.1007/s00125-010-1832-7
- Schwenk, R. W., Holloway, G. P., Luiken, J. J., Bonen, A. et Glatz, J. F. (2010). Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82(4-6), 149-154. doi: 10.1016/j.plefa.2010.02.029
- Schwenke, D. C. et Carew, T. E. (1989). Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*, 9(6), 908-918.
- Seal, J. B. et Gewertz, B. L. (2005). Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg*, 19(4), 572-584. doi: 10.1007/s10016-005-4616-7
- Sebastian, D., Guitart, M., Garcia-Martinez, C., Mauvezin, C., Orellana-Gavalda, J. M., Serra, D., Gomez-Foix, A. M., Hegardt, F. G. et Asins, G. (2009). Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *J Lipid Res*, 50(9), 1789-1799. doi: 10.1194/jlr.M800535-JLR200
- Seiler, C., Stoller, M., Pitt, B. et Meier, P. (2013). The human coronary collateral circulation: development and clinical importance. *Eur Heart J*, 34(34), 2674-2682. doi: 10.1093/eurheartj/eh195
- Seim, I., Collet, C., Herington, A. C. et Chopin, L. K. (2007). Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics*, 8, 298. doi: 10.1186/1471-2164-8-298
- Seimon, T. A., Nadolski, M. J., Liao, X., Magallon, J., Nguyen, M., Feric, N. T., Koschinsky, M. L., Harkewicz, R., Witztum, J. L., Tsimikas, S., Golenbock, D., Moore, K. J. et

- Tabas, I. (2010). Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab*, 12(5), 467-482. doi: 10.1016/j.cmet.2010.09.010
- SenBanerjee, S., Lin, Z., Atkins, G. B., Greif, D. M., Rao, R. M., Kumar, A., Feinberg, M. W., Chen, Z., Simon, D. I., Lusinskas, F. W., Michel, T. M., Gimbrone, M. A., Jr., Garcia-Cardena, G. et Jain, M. K. (2004). KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med*, 199(10), 1305-1315. doi: 10.1084/jem.20031132
- Sery, O., Janoutova, J., Ewerlingova, L., Halova, A., Lochman, J., Janout, V., Khan, N. A. et Balcar, V. J. (2017). CD36 gene polymorphism is associated with Alzheimer's disease. *Biochimie*, 135, 46-53. doi: 10.1016/j.biochi.2017.01.009
- Shamsul, H. M., Hasebe, A., Iyori, M., Ohtani, M., Kiura, K., Zhang, D., Totsuka, Y. et Shibata, K. (2010). The Toll-like receptor 2 (TLR2) ligand FSL-1 is internalized via the clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2. *Immunology*, 130(2), 262-272. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03232.x
- Sharif-Paghaleh, E., Yap, M. L., Puhl, S. L., Badar, A., Torres, J. B., Chuamsaamarkkee, K., Kampmeier, F., Smith, R. A., Clark, J., Blower, P. J., Sacks, S. et Mullen, G. E. (2017). Non-Invasive whole-body detection of complement activation using radionuclide imaging in a mouse model of myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Sci Rep*, 7(1), 16090. doi: 10.1038/s41598-017-16387-1
- Shaw, S. (1987). Characterization of human leukocyte differentiation antigens. *Immunol Today*, 8(1), 1-3. doi: 10.1016/0167-5699(87)90816-4
- Sheedy, F. J., Grebe, A., Rayner, K. J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S. B., Becker, C. E., Ediriweera, H. N., Mullick, A. E., Golenbock, D. T., Stuart, L. M., Latz, E., Fitzgerald, K. A. et Moore, K. J. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol*, 14(8), 812-820. doi: 10.1038/ni.2639
- Shibata, R., Ouchi, N., Ito, M., Kihara, S., Shiojima, I., Pimentel, D. R., Kumada, M., Sato, K., Schiekofer, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Colucci, W. S. et Walsh, K. (2004). Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med*, 10(12), 1384-1389. doi: 10.1038/nm1137
- Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D. R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N. et Walsh, K. (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med*, 11(10), 1096-1103. doi: 10.1038/nm1295
- Shinmura, K., Tamaki, K., Saito, K., Nakano, Y., Tobe, T. et Bolli, R. (2007). Cardioprotective effects of short-term caloric restriction are mediated by adiponectin via activation of AMP-activated protein kinase. *Circulation*, 116(24), 2809-2817. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.725697
- Shinoda, Y., Yamaguchi, M., Ogata, N., Akune, T., Kubota, N., Yamauchi, T., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Ikeda, T., Hoshi, K., Chung, U. I., Nakamura, K. et Kawaguchi, H. (2006). Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem*, 99(1), 196-208. doi: 10.1002/jcb.20890

- Shioura, K. M., Geenen, D. L. et Goldspink, P. H. (2008). Sex-related changes in cardiac function following myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(2), R528-534. doi: 10.1152/ajpregu.90342.2008
- Siddiqi, S., Sheth, A., Patel, F., Barnes, M. et Mansbach, C. M., 2nd. (2013). Intestinal caveolin-1 is important for dietary fatty acid absorption. *Biochim Biophys Acta*, 1831(8), 1311-1321. doi: 10.1016/j.bbali.2013.05.001
- Silverstein, R. L. et Febbraio, M. (2000). CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 11(5), 483-491.
- Silverstein, R. L. et Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*, 2(72), re3. doi: 10.1126/scisignal.272re3
- Silverstein, R. L., Li, W., Park, Y. M. et Rahaman, S. O. (2010). Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 121, 206-220.
- Skurk, C., Wittchen, F., Suckau, L., Witt, H., Noutsias, M., Fechner, H., Schultheiss, H. P. et Poller, W. (2008). Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*, 29(9), 1168-1180. doi: 10.1093/eurheartj/ehn136
- Smith, J., Su, X., El-Maghrabi, R., Stahl, P. D. et Abumrad, N. A. (2008). Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J Biol Chem*, 283(20), 13578-13585. doi: 10.1074/jbc.M800008200
- Smith, J. S. et Rajagopal, S. (2016). The beta-Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem*, 291(17), 8969-8977. doi: 10.1074/jbc.R115.713313
- Smith, R. G., Pong, S. S., Hickey, G., Jacks, T., Cheng, K., Leonard, R., Cohen, C. J., Arena, J. P., Chang, C. H., Drisko, J., Wyvratt, M., Fisher, M., Nargund, R. et Patchett, A. (1996). Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Recent Prog Horm Res*, 51, 261-285; discussion 285-266.
- Soccio, R. E., Chen, E. R. et Lazar, M. A. (2014). Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes. *Cell Metab*, 20(4), 573-591. doi: 10.1016/j.cmet.2014.08.005
- Soehnlein, O. et Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10(6), 427-439. doi: 10.1038/nri2779
- Solaini, G. et Harris, D. A. (2005). Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*, 390(Pt 2), 377-394. doi: 10.1042/BJ20042006
- Son, N. H., Park, T. S., Yamashita, H., Yokoyama, M., Huggins, L. A., Okajima, K., Homma, S., Szabolcs, M. J., Huang, L. S. et Goldberg, I. J. (2007). Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. *J Clin Invest*, 117(10), 2791-2801. doi: 10.1172/JCI30335
- Soonpaa, M. H. et Field, L. J. (1998). Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res*, 83(1), 15-26.
- Sousa, J. S., D'Imprima, E. et Vonck, J. (2018). Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell Biochem*, 87, 167-227. doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_7
- Spitsberg, V. L., Matitashvili, E. et Gorewit, R. C. (1995). Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland. *Eur J Biochem*, 230(3), 872-878.

- Spotnitz, H. M., Sonnenblick, E. H. et Spiro, D. (1966). Relation of ultrastructure to function in the intact heart: sarcomere structure relative to pressure volume curves of intact left ventricles of dog and cat. *Circ Res*, 18(1), 49-66.
- St-Pierre, D. H., Karelis, A. D., Coderre, L., Malita, F., Fontaine, J., Mignault, D., Brochu, M., Bastard, J. P., Cianflone, K., Doucet, E., Imbeault, P. et Rabasa-Lhoret, R. (2007). Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(1), 264-269. doi: 10.1210/jc.2006-1603
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. et Brand, M. D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem*, 277(47), 44784-44790. doi: 10.1074/jbc.M207217200
- Staes, E., Absil, P. A., Lins, L., Brasseur, R., Deleu, M., Lecouturier, N., Fievez, V., Rieux, A., Mingeot-Leclercq, M. P., Raussens, V. et Preat, V. (2010). Acylated and unacylated ghrelin binding to membranes and to ghrelin receptor: towards a better understanding of the underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1798(11), 2102-2113. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.07.002
- Stanley, W. C., Recchia, F. A. et Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 85(3), 1093-1129. doi: 10.1152/physrev.00006.2004
- Staprans, I., Pan, X. M., Rapp, J. H. et Feingold, K. R. (2003). Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. *J Lipid Res*, 44(4), 705-715. doi: 10.1194/jlr.M200266-JLR200
- Steendijk, P., Staal, E., Jukema, J. W. et Baan, J. (2001). Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(2), H755-763. doi: 10.1152/ajpheart.2001.281.2.H755
- Steinbrecher, U. P. (1988). Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 959(1), 20-30.
- Steinbusch, L. K., Luiken, J. J., Vlasblom, R., Chabowski, A., Hoebbers, N. T., Coumans, W. A., Vroegrijk, I. O., Voshol, P. J., Ouwens, D. M., Glatz, J. F. et Diamant, M. (2011). Absence of fatty acid transporter CD36 protects against Western-type diet-related cardiac dysfunction following pressure overload in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301(4), E618-627. doi: 10.1152/ajpendo.00106.2011
- Steinbusch, L. K., Schwenk, R. W., Ouwens, D. M., Diamant, M., Glatz, J. F. et Luiken, J. J. (2011). Subcellular trafficking of the substrate transporters GLUT4 and CD36 in cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci*, 68(15), 2525-2538. doi: 10.1007/s00018-011-0690-x
- Stievenard, A., Mequinion, M., Andrews, Z. B., Destee, A., Chartier-Harlin, M. C., Viltart, O. et Vanbesien-Mailliot, C. C. (2017). Is there a role for ghrelin in central dopaminergic systems? Focus on nigrostriatal and mesocorticolimbic pathways. *Neurosci Biobehav Rev*, 73, 255-275. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.11.021
- Su, X. et Abumrad, N. A. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab*, 20(2), 72-77. doi: 10.1016/j.tem.2008.11.001
- Suchankova, G., Nelson, L. E., Gerhart-Hines, Z., Kelly, M., Gauthier, M. S., Saha, A. K., Ido, Y., Puigserver, P. et Ruderman, N. B. (2009). Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 378(4), 836-841. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.130

- Suckling, K. (2006). Discontinued drugs in 2005: cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs*, 15(11), 1299-1308. doi: 10.1517/13543784.15.11.1299
- Suehiro, K., Takuma, S., Shimizu, J., Hozumi, T., Yano, H., Cardinale, C., DiTullio, M. R., Wang, J., Smith, C. R., Burkhoff, D. et Homma, S. (2001). Assessment of left ventricular systolic function using contrast two-dimensional echocardiography with a high-frequency transducer in the awake murine model of myocardial infarction. *Jpn Circ J*, 65(11), 979-983.
- Suga, H. et Sagawa, K. (1974). Instantaneous pressure-volume relationships and their ratio in the excised, supported canine left ventricle. *Circ Res*, 35(1), 117-126.
- Sugden, M. C. et Holness, M. J. (2003). Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(5), E855-862. doi: 10.1152/ajpendo.00526.2002
- Sun, M., Finnemann, S. C., Febbraio, M., Shan, L., Annangudi, S. P., Podrez, E. A., Hoppe, G., Darrow, R., Organisciak, D. T., Salomon, R. G., Silverstein, R. L. et Hazen, S. L. (2006). Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *J Biol Chem*, 281(7), 4222-4230. doi: 10.1074/jbc.M509769200
- Sun, N., Wang, H. et Wang, L. (2016). Protective effects of ghrelin against oxidative stress, inducible nitric oxide synthase and inflammation in a mouse model of myocardial ischemia/reperfusion injury via the HMGB1 and TLR4/NF-kappaB pathway. *Mol Med Rep*, 14(3), 2764-2770. doi: 10.3892/mmr.2016.5535
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M. et Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397(6718), 441-446. doi: 10.1038/17135
- Sussman, M. A., Volkers, M., Fischer, K., Bailey, B., Cottage, C. T., Din, S., Gude, N., Avitabile, D., Alvarez, R., Sundararaman, B., Quijada, P., Mason, M., Konstandin, M. H., Malhowski, A., Cheng, Z., Khan, M. et McGregor, M. (2011). Myocardial AKT: the omnipresent nexus. *Physiol Rev*, 91(3), 1023-1070. doi: 10.1152/physrev.00024.2010
- Sutherland, F. J. et Hearse, D. J. (2000). The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res*, 41(6), 613-627. doi: 10.1006/phrs.1999.0653
- Suzuki, Y., Yeung, A. C. et Ikeno, F. (2011). The representative porcine model for human cardiovascular disease. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 195483. doi: 10.1155/2011/195483
- Swerlick, R. A., Lee, K. H., Wick, T. M. et Lawley, T. J. (1992). Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol*, 148(1), 78-83.
- Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R. et Pittet, M. J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytes and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*, 117(1), 195-205. doi: 10.1172/JCI29950
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J. L., Kohler, R. H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T. R., Libby, P., Weissleder, R. et Pittet, M. J. (2009). Identification of splenic reservoir

- monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325(5940), 612-616. doi: 10.1126/science.1175202
- Szentirmai, E., Kapas, L. et Krueger, J. M. (2007). Ghrelin microinjection into forebrain sites induces wakefulness and feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292(1), R575-585. doi: 10.1152/ajpregu.00448.2006
- Szijarto, A., Czigany, Z., Turoczi, Z. et Harsanyi, L. (2012). Remote ischemic preconditioning-a simple, low-risk method to decrease ischemic reperfusion injury: models, protocols and mechanistic background. A review. *J Surg Res*, 178(2), 797-806. doi: 10.1016/j.jss.2012.06.067
- Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*, 10(1), 36-46. doi: 10.1038/nri2675
- Taegtmeier, H. (1995). One hundred years ago: Oscar Langendorff and the birth of cardiac metabolism. *Can J Cardiol*, 11(11), 1030-1035.
- Tajbakhsh, A., Rezaee, M., Kovanen, P. T. et Sahebkar, A. (2018). Efferocytosis in atherosclerotic lesions: Malfunctioning regulatory pathways and control mechanisms. *Pharmacol Ther*, 188, 12-25. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.02.003
- Takagi, M., Takakubo, Y., Pajarinen, J., Naganuma, Y., Oki, H., Maruyama, M. et Goodman, S. B. (2017). Danger of frustrated sensors: Role of Toll-like receptors and NOD-like receptors in aseptic and septic inflammations around total hip replacements. *J Orthop Translat*, 10, 68-85. doi: 10.1016/j.jot.2017.05.004
- Takahashi, K., Fukushima, S., Yamahara, K., Yashiro, K., Shintani, Y., Coppen, S. R., Salem, H. K., Brouillette, S. W., Yacoub, M. H. et Suzuki, K. (2008). Modulated inflammation by injection of high-mobility group box 1 recovers post-infarction chronically failing heart. *Circulation*, 118(14 Suppl), S106-114. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757443
- Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Iwakura, H., Yoshimoto, A., Harada, M., Mori, K., Komatsu, Y., Usui, T., Shimatsu, A., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, M., Kangawa, K. et Nakao, K. (2000). Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12), 4908-4911. doi: 10.1210/jcem.85.12.7167
- Taketa, K., Matsumura, T., Yano, M., Ishii, N., Senokuchi, T., Motoshima, H., Murata, Y., Kim-Mitsuyama, S., Kawada, T., Itabe, H., Takeya, M., Nishikawa, T., Tsuruzoe, K. et Araki, E. (2008). Oxidized low density lipoprotein activates peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARgamma through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages. *J Biol Chem*, 283(15), 9852-9862. doi: 10.1074/jbc.M703318200
- Tal-Gan, Y., Freeman, N. S., Klein, S., Levitzki, A. et Gilon, C. (2011). Metabolic stability of peptidomimetics: N-methyl and aza heptapeptide analogs of a PKB/Akt inhibitor. *Chem Biol Drug Des*, 78(5), 887-892. doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01207.x
- Tall, A. R. et Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 15(2), 104-116. doi: 10.1038/nri3793
- Talle, M. A., Rao, P. E., Westberg, E., Allegar, N., Makowski, M., Mittler, R. S. et Goldstein, G. (1983). Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cell Immunol*, 78(1), 83-99.
- Talman, V. et Ruskoaho, H. (2016). Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*, 365(3), 563-581. doi: 10.1007/s00441-016-2431-9

- Tan, C. P., McKee, K. K., Liu, Q., Palyha, O. C., Feighner, S. D., Hreniuk, D. L., Smith, R. G. et Howard, A. D. (1998). Cloning and characterization of a human and murine T-cell orphan G-protein-coupled receptor similar to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics*, 52(2), 223-229. doi: 10.1006/geno.1998.5441
- Tan, S. X., Ng, Y., Burchfield, J. G., Ramm, G., Lambright, D. G., Stockli, J. et James, D. E. (2012). The Rab GTPase-activating protein TBC1D4/AS160 contains an atypical phosphotyrosine-binding domain that interacts with plasma membrane phospholipids to facilitate GLUT4 trafficking in adipocytes. *Mol Cell Biol*, 32(24), 4946-4959. doi: 10.1128/MCB.00761-12
- Tanaka, M., Hayashida, Y., Iguchi, T., Nakao, N., Nakai, N. et Nakashima, K. (2001). Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology*, 142(8), 3697-3700. doi: 10.1210/endo.142.8.8433
- Tanaka, T., Nakata, T., Oka, T., Ogawa, T., Okamoto, F., Kusaka, Y., Sohmiya, K., Shimamoto, K. et Itakura, K. (2001). Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations. *J Lipid Res*, 42(5), 751-759.
- Tandon, N. N., Kralisz, U. et Jamieson, G. A. (1989). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*, 264(13), 7576-7583.
- Tandon, N. N., Lipsky, R. H., Burgess, W. H. et Jamieson, G. A. (1989). Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*, 264(13), 7570-7575.
- Tao, H., Yancey, P. G., Babaev, V. R., Blakemore, J. L., Zhang, Y., Ding, L., Fazio, S. et Linton, M. F. (2015). Macrophage SR-BI mediates efferocytosis via Src/PI3K/Rac1 signaling and reduces atherosclerotic lesion necrosis. *J Lipid Res*, 56(8), 1449-1460. doi: 10.1194/jlr.M056689
- Tao, L., Gao, E., Jiao, X., Yuan, Y., Li, S., Christopher, T. A., Lopez, B. L., Koch, W., Chan, L., Goldstein, B. J. et Ma, X. L. (2007). Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation*, 115(11), 1408-1416. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.666941
- Tao, N., Wagner, S. J. et Lublin, D. M. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem*, 271(37), 22315-22320.
- Tarnavski, O., McMullen, J. R., Schinke, M., Nie, Q., Kong, S. et Izumo, S. (2004). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics*, 16(3), 349-360. doi: 10.1152/physiolgenomics.00041.2003
- Tawa, M., Yamamoto, S., Ohkita, M. et Matsumura, Y. (2012). Endothelin-1 and norepinephrine overflow from cardiac sympathetic nerve endings in myocardial ischemia. *Cardiol Res Pract*, 2012, 789071. doi: 10.1155/2012/789071
- Taylor, K. R., Trowbridge, J. M., Rudisill, J. A., Termeer, C. C., Simon, J. C. et Gallo, R. L. (2004). Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem*, 279(17), 17079-17084. doi: 10.1074/jbc.M310859200
- Teboul, L., Febbraio, M., Gaillard, D., Amri, E. Z., Silverstein, R. et Grimaldi, P. A. (2001). Structural and functional characterization of the mouse fatty acid translocase promoter: activation during adipose differentiation. *Biochem J*, 360(Pt 2), 305-312.
- Tena-Sempere, M., Barreiro, M. L., Gonzalez, L. C., Gaytan, F., Zhang, F. P., Caminos, J. E., Pinilla, L., Casanueva, F. F., Dieguez, C. et Aguilar, E. (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*, 143(2), 717-725. doi: 10.1210/endo.143.2.8646

- Thielmann, M., Kottenberg, E., Kleinbongard, P., Wendt, D., Gedik, N., Pasa, S., Price, V., Tsagakis, K., Neuhauser, M., Peters, J., Jakob, H. et Heusch, G. (2013). Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*, 382(9892), 597-604. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61450-6
- Thompson-Gorman, S. L. et Zweier, J. L. (1990). Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem*, 265(12), 6656-6663.
- Thompson, N. M., Gill, D. A., Davies, R., Loveridge, N., Houston, P. A., Robinson, I. C. et Wells, T. (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology*, 145(1), 234-242. doi: 10.1210/en.2003-0899
- Thorne, R. F., Ralston, K. J., de Bock, C. E., Mhaidat, N. M., Zhang, X. D., Boyd, A. W. et Burns, G. F. (2010). Palmitoylation of CD36/FAT regulates the rate of its post-transcriptional processing in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1803(11), 1298-1307. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.07.002
- Thorp, E. et Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol*, 86(5), 1089-1095. doi: 10.1189/jlb.0209115
- Thors, B., Halldorsson, H. et Thorgeirsson, G. (2004). Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt. *FEBS Lett*, 573(1-3), 175-180. doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.078
- Thune, J. J. et Solomon, S. D. (2006). Left ventricular diastolic function following myocardial infarction. *Curr Heart Fail Rep*, 3(4), 170-174.
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., White, H. D., Joint, E. S. C. A. A. H. A. W. H. F. T. F. f. U. D. o. M. I., Authors/Task Force Members, C., Thygesen, K., Alpert, J. S., White, H. D., Biomarker, S., Jaffe, A. S., Katus, H. A., Apple, F. S., Lindahl, B., Morrow, D. A., Subcommittee, E. C. G., Chaitman, B. R., Clemmensen, P. M., Johanson, P., Hod, H., Imaging, S., Underwood, R., Bax, J. J., Bonow, J. J., Pinto, F., Gibbons, R. J., Classification, S., Fox, K. A., Atar, D., Newby, L. K., Galvani, M., Hamm, C. W., Intervention, S., Uretsky, B. F., Steg, P. G., Wijns, W., Bassand, J. P., Menasche, P., Ravkilde, J., Trials, Registries, S., Ohman, E. M., Antman, E. M., Wallentin, L. C., Armstrong, P. W., Simoons, M. L., Trials, Registries, S., Januzzi, J. L., Nieminen, M. S., Gheorghide, M., Filippatos, G., Trials, Registries, S., Luepker, R. V., Fortmann, S. P., Rosamond, W. D., Levy, D., Wood, D., Trials, Registries, S., Smith, S. C., Hu, D., Lopez-Sendon, J. L., Robertson, R. M., Weaver, D., Tendera, M., Bove, A. A., Parkhomenko, A. N., Vasilieva, E. J., Mendis, S., Guidelines, E. S. C. C. f. P., Bax, J. J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B. A., Reiner, Z., Sechtem, U., Sirnes, P. A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., Document, R., Morais, J., Aguiar, C., Almahmeed, W., Arnar, D. O., Barili, F., Bloch, K. D., Bolger, A. F., Botker, H. E., Bozkurt, B., Bugiardini, R., Cannon, C., de Lemos, J., Eberli, F. R., Escobar, E., Hlatky, M., James, S., Kern, K. B., Moliterno, D. J., Mueller, C., Neskovic, A. N., Pieske, B. M., Schulman, S. P., Storey, R. F., Taubert, K. A., Vranckx, P. et Wagner, D. R. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 60(16), 1581-1598. doi: 10.1016/j.jacc.2012.08.001

- Tirodkar, T. S. et Voelkel-Johnson, C. (2012). Sphingolipids in apoptosis. *Exp Oncol*, 34(3), 231-242.
- Togliatto, G., Trombetta, A., Dentelli, P., Gallo, S., Rosso, A., Cotogni, P., Granata, R., Falcioni, R., Delale, T., Ghigo, E. et Brizzi, M. F. (2015). Unacylated ghrelin induces oxidative stress resistance in a glucose intolerance and peripheral artery disease mouse model by restoring endothelial cell miR-126 expression. *Diabetes*, 64(4), 1370-1382. doi: 10.2337/db14-0991
- Tolle, V., Zizzari, P., Tomasetto, C., Rio, M. C., Epelbaum, J. et Bluet-Pajot, M. T. (2001). In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 73(1), 54-61. doi: 10.1159/000054620
- Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C. et Murphy, E. (2002). Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res*, 90(4), 377-379.
- Tong, J., Dave, N., Mugundu, G. M., Davis, H. W., Gaylinn, B. D., Thorner, M. O., Tschop, M. H., D'Alessio, D. et Desai, P. B. (2013). The pharmacokinetics of acyl, des-acyl, and total ghrelin in healthy human subjects. *Eur J Endocrinol*, 168(6), 821-828. doi: 10.1530/EJE-13-0072
- Tong, J., Davis, H. W., Summer, S., Benoit, S. C., Haque, A., Bidlingmaier, M., Tschop, M. H. et D'Alessio, D. (2014). Acute administration of unacylated ghrelin has no effect on Basal or stimulated insulin secretion in healthy humans. *Diabetes*, 63(7), 2309-2319. doi: 10.2337/db13-1598
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A. et Evans, R. M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93(2), 241-252.
- Topper, J. N., Cai, J., Falb, D. et Gimbrone, M. A., Jr. (1996). Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(19), 10417-10422.
- Torsello, A., Bresciani, E., Rossoni, G., Avallone, R., Tulipano, G., Cocchi, D., Bulgarelli, I., Deghenghi, R., Berti, F. et Locatelli, V. (2003). Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology*, 144(5), 1787-1792. doi: 10.1210/en.2002-221048
- Tran, D. T., Welsh, R. C., Ohinmaa, A., Thanh, N. X., Bagai, A. et Kaul, P. (2017). Quality of Acute Myocardial Infarction Care in Canada: A 10-Year Review of 30-Day In-Hospital Mortality and 30-Day Hospital Readmission. *Can J Cardiol*, 33(10), 1319-1326. doi: 10.1016/j.cjca.2017.06.014
- Tran, T. T., Poirier, H., Clement, L., Nassir, F., Pelsers, M. M., Petit, V., Degrace, P., Monnot, M. C., Glatz, J. F., Abumrad, N. A., Besnard, P. et Niot, I. (2011). Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J Biol Chem*, 286(28), 25201-25210. doi: 10.1074/jbc.M111.233551
- Trayhurn, P. et Bing, C. (2006). Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1471), 1237-1249. doi: 10.1098/rstb.2006.1859
- Tretter, L. et Adam-Vizi, V. (2000). Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*, 20(24), 8972-8979.

- Tretter, L. et Adam-Vizi, V. (2005). Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1464), 2335-2345. doi: 10.1098/rstb.2005.1764
- Triantafilou, M., Gamper, F. G., Haston, R. M., Mouratis, M. A., Morath, S., Hartung, T. et Triantafilou, K. (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem*, 281(41), 31002-31011. doi: 10.1074/jbc.M602794200
- Trudel, L., Tomasetto, C., Rio, M. C., Bouin, M., Plourde, V., Eberling, P. et Poitras, P. (2002). Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(6), G948-952. doi: 10.1152/ajpgi.00339.2001
- Truong, T. Q., Aubin, D., Bourgeois, P., Falstrault, L. et Brissette, L. (2006). Opposite effect of caveolin-1 in the metabolism of high-density and low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1761(1), 24-36. doi: 10.1016/j.bbali.2005.12.004
- Tschop, M., Smiley, D. L. et Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407(6806), 908-913. doi: 10.1038/35038090
- Tschop, M., Wawarta, R., Riepl, R. L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R. et Folwaczny, C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*, 24(6), RC19-21. doi: 10.1007/BF03351037
- Tsuruta, F., Masuyama, N. et Gotoh, Y. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway suppresses Bax translocation to mitochondria. *J Biol Chem*, 277(16), 14040-14047. doi: 10.1074/jbc.M108975200
- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A. S., Kaushal, C. et Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*, 2(4), 236-240. doi: 10.4103/2231-4040.90879
- Ueberberg, B., Unger, N., Saeger, W., Mann, K. et Petersenn, S. (2009). Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res*, 41(11), 814-821. doi: 10.1055/s-0029-1233462
- Ugwu, F. N., Yu, A. P., Sin, T. K., Tam, B. T., Lai, C. W., Wong, S. C. et Siu, P. M. (2017). Protective Effect of Unacylated Ghrelin on Compression-Induced Skeletal Muscle Injury Mediated by SIRT1-Signaling. *Front Physiol*, 8, 962. doi: 10.3389/fphys.2017.00962
- Uittenbogaard, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Blair, A. et Smart, E. J. (2000). High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem*, 275(15), 11278-11283.
- Ungvari, Z., Wolin, M. S. et Csiszar, A. (2006). Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling? *Antioxid Redox Signal*, 8(7-8), 1121-1129. doi: 10.1089/ars.2006.8.1121
- Ushio-Fukai, M. (2006). Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res*, 71(2), 226-235. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.04.015
- van Amerongen, M. J., Harmsen, M. C., van Rooijen, N., Petersen, A. H. et van Luyn, M. J. (2007). Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol*, 170(3), 818-829. doi: 10.2353/ajpath.2007.060547

- van Hall, G., Sacchetti, M., Radegran, G. et Saltin, B. (2002). Human skeletal muscle fatty acid and glycerol metabolism during rest, exercise and recovery. *J Physiol*, 543(Pt 3), 1047-1058.
- van Hout, G. P., Bosch, L., Ellenbroek, G. H., de Haan, J. J., van Solinge, W. W., Cooper, M. A., Arslan, F., de Jager, S. C., Robertson, A. A., Pasterkamp, G. et Hoefler, I. E. (2017). The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 38(11), 828-836. doi: 10.1093/eurheartj/ehw247
- Van Nieuwenhoven, F. A., Luiken, J. J., De Jong, Y. F., Grimaldi, P. A., Van der Vusse, G. J. et Glatz, J. F. (1998). Stable transfection of fatty acid translocase (CD36) in a rat heart muscle cell line (H9c2). *J Lipid Res*, 39(10), 2039-2047.
- Van Nieuwenhoven, F. A., Verstijnen, C. P., Abumrad, N. A., Willemsen, P. H., Van Eys, G. J., Van der Vusse, G. J. et Glatz, J. F. (1995). Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun*, 207(2), 747-752.
- Verhaar, M. C., Westerweel, P. E., van Zonneveld, A. J. et Rabelink, T. J. (2004). Free radical production by dysfunctional eNOS. *Heart*, 90(5), 494-495.
- Vestergaard, E. T., Gormsen, L. C., Jessen, N., Lund, S., Hansen, T. K., Moller, N. et Jorgensen, J. O. (2008). Ghrelin infusion in humans induces acute insulin resistance and lipolysis independent of growth hormone signaling. *Diabetes*, 57(12), 3205-3210. doi: 10.2337/db08-0025
- Vincent, J. P., Mazella, J. et Kitabgi, P. (1999). Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 20(7), 302-309.
- Vinten-Johansen, J. (2004). Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 61(3), 481-497. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.10.011
- Violin, J. D., Zhang, J., Tsien, R. Y. et Newton, A. C. (2003). A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J Cell Biol*, 161(5), 899-909. doi: 10.1083/jcb.200302125
- Virag, J. A. et Lust, R. M. (2011). Coronary artery ligation and intramyocardial injection in a murine model of infarction. *J Vis Exp*(52). doi: 10.3791/2581
- Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D. et Farb, A. (2002). Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol*, 15(6), 439-446.
- Vodnik, M., Strukelj, B. et Lunder, M. (2016). Ghrelin Receptor Ligands Reaching Clinical Trials: From Peptides to Peptidomimetics; from Agonists to Antagonists. *Horm Metab Res*, 48(1), 1-15. doi: 10.1055/s-0035-1564149
- Volante, M., Fulcheri, E., Allia, E., Cerrato, M., Pucci, A. et Papotti, M. (2002). Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem*, 50(8), 1013-1021. doi: 10.1177/002215540205000803
- Wakil, S. J. et Abu-Elheiga, L. A. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S138-143. doi: 10.1194/jlr.R800079-JLR200
- Walsh, S. R., Tang, T. Y., Kullar, P., Jenkins, D. P., Dutka, D. P. et Gaunt, M. E. (2008). Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg*, 34(5), 985-994. doi: 10.1016/j.ejcts.2008.07.062

- Wang, F., Keimig, T., He, Q., Ding, J., Zhang, Z., Pourabdollah-Nejad, S. et Yang, X. P. (2007). Augmented healing process in female mice with acute myocardial infarction. *Genet Med*, 4(3), 230-247.
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R., Bhutta, Z., Carter, A., Casey, D., Charlson, F., Chen, A., Coates, M., Coggeshall, M., Dandona, L., Dicker, D., Erskine, H., Ferrari, A., Fitzmaurice, C., Foreman, K., Forouzanfar, M., Fraser, M., Fullman, N., Gething, P., Goldberg, E., Graetz, N., Haagsma, J., Hay, S., Huynh, C., Johnson, C., Kassebaum, N., Kinfu, Y., Kulikoff, X., Kutz, M., Kyu, H., Larson, H., Leung, J., Liang, X., Lim, S., Lind, M., Lozano, R., Marquez, N., Mensah, G., Mikesell, J., Mokdad, A., Mooney, M., Nguyen, G., Nsoesie, E., Pigott, D., Pinho, C., Roth, G., Salomon, J., Sandar, L., Silpakit, N., Sligar, A., Sorensen, R., Stanaway, J., Steiner, C., Teeple, S., Thomas, B., Troeger, C., VanderZanden, A., Vollset, S., Wanga, V., Whiteford, H., Wolock, T., Zockler, L., Abate, K., Abbafati, C., Abbas, K., Abd-Allah, F., Abera, S., Abreu, D., Abu-Raddad, L., Abyu, G., Achoki, T., Adelekan, A., Ademi, Z., Adou, A., Adsuar, J., Afanvi, K., Afshin, A., Agardh, E., Agarwal, A., Agrawal, A., Kiadaliri, A., Ajala, O., Akanda, A., Akinyemi, R., Akinyemiju, T., Akseer, N., Lami, F., Alabed, S., Al-Aly, Z., Alam, K., Alam, N., Alasfoor, D., Aldahri, S., Aldridge, R., Alegretti, M., Aleman, A., Alemu, Z., Alexander, L., Alhabib, S., Ali, R., Alkerwi, A., Alla, F., Allebeck, P., Al-Raddadi, R., Alsharif, U., Altirkawi, K., Martin, E., Alvis-Guzman, N., Amare, A., Amegah, A., Ameh, E., Amini, H., Ammar, W., Amrock, S., Andersen, H., Anderson, B., Anderson, G., Antonio, C., Aregay, A., Ärnlöv, J., Arsenijevic, V., Artaman, A., Asayesh, H., Asghar, R., Atique, S., Avokpaho, E., Awasthi, A., Azzopardi, P., Bacha, U., Badawi, A., Bahit, M., Balakrishnan, K., Banerjee, A., Barac, A., Barker-Collo, S., Bärnighausen, T., Barregard, L., Barrero, L., Basu, A., Basu, S., Bayou, Y., Bazargan-Hejazi, S., Beardsley, J., Bedi, N., Beghi, E., Belay, H., Bell, B., Bell, M., Bello, A., Bennett, D., Bensenor, I., Berhane, A., Bernabé, E., Betsu, B., Beyene, A., Bhala, N., Bhalla, A., Biadgilign, S., Bikbov, B., Bin, A., AA, Biroscak, B., Biryukov, S., Bjertness, E., Blore, J., Blosser, C., Bohensky, M., Borschmann, R., Bose, D., Bourne, R., Brainin, M., Brayne, C., Brazinova, A., Breitborde, N., Brenner, H., Brewer, J., Brown, A., Brown, J., Brugha, T., Buckle, G., Butt, Z., Calabria, B., Campos-Nonato, I., Campuzano, J., Carapetis, J., Cárdenas, R., Carpenter, D., Carrero, J., Castañeda-Orjuela, C., Rivas, J., Catalá-López, F., Cavalleri, F., Cercy, K., Cerda, J., Chen, W., Chew, A., Chiang, P., Chibalabala, M., Chibueze, C., Chimed-Ochir, O., Chisumpa, V., Choi, J., Chowdhury, R., Christensen, H., Christopher, D., Ciobanu, L., Cirillo, M., Cohen, A., Colistro, V., Colomar, M., Colquhoun, S., Cooper, C., Cooper, L., Cortinovis, M., Cowie, B., Crump, J., Damsere-Derry, J., Danawi, H., Dandona, R., Daoud, F., Darby, S., Dargan, P., das, N., J, Davey, G., Davis, A., Davitoiu, D., de, C., EF, de, J., P, Leo, D., Degenhardt, L., Dellavalle, R., Deribe, K., Deribew, A., Dharmaratne, S., Dhillon, P., Diaz-Torné, C., Ding, E., Dos, S., KP, Dossou, E., Driscoll, T., Duan, L., Dubey, M., Duncan, B., Ellenbogen, R., Ellingsen, C., Elyazar, I., Endries, A., Ermakov, S., Eshrati, B., Esteghamati, A., Estep, K., Faghmous, I., Fahimi, S., Faraon, E., Farid, T., Farinha, C., Faro, A., Farvid, M., Farzadfar, F., Feigin, V., Fereshtehnejad, S., Fernandes, J., Fernandes, J., Fischer, F., Fitchett, J., Flaxman, A., Foigt, N., Fowkes, F., Franca, E., Franklin, R., Friedman, J., Frostad, J., Fürst, T., Futran, N., Gall, S., Gambashidze, K., Gamkrelidze, A., Ganguly, P., Gankpé, F., Gebre, T., Gebrehiwot, T., Gebremedhin, A., Gebru, A., Geleijnse, J., Gessner, B., Ghoshal, A.,

Gibney, K., Gillum, R., Gilmour, S., Giref, A., Giroud, M., Gishu, M., Giussani, G., Glaser, E., Godwin, W., Gomez-Dantes, H., Gona, P., Goodridge, A., Gopalani, S., Gosselin, R., Gotay, C., Goto, A., Gouda, H., Greaves, F., Gugnani, H., Gupta, R., Gupta, R., Gupta, V., Gutiérrez, R., Hafezi-Nejad, N., Haile, D., Hailu, A., Hailu, G., Halasa, Y., Hamadeh, R., Hamidi, S., Hancock, J., Handal, A., Hankey, G., Hao, Y., Harb, H., Harikrishnan, S., Haro, J., Havmoeller, R., Heckbert, S., Heredia-Pi, I., Heydarpour, P., Hilderink, H., Hoek, H., Hogg, R., Horino, M., Horita, N., Hosgood, H., Hotez, P., Hoy, D., Hsairi, M., Htet, A., Htike, M., Hu, G., Huang, C., Huang, H., Huiart, L., Husseini, A., Huybrechts, I., Huynh, G., Iburg, K., Innos, K., Inoue, M., Iyer, V., Jacobs, T., Jacobsen, K., Jahanmehr, N., Jakovljevic, M., James, P., Javanbakht, M., Jayaraman, S., Jayatilleke, A., Jeemon, P., Jensen, P., Jha, V., Jiang, G., Jiang, Y., Jibat, T., Jimenez-Corona, A., Jonas, J., Joshi, T., Kabir, Z., Kamal, R., Kan, H., Kant, S., Karch, A., Karema, C., Karimkhani, C., Karletsos, D., Karthikeyan, G., Kasaeian, A., Katibeh, M., Kaul, A., Kawakami, N., Kayibanda, J., Keiyoro, P., Kemmer, L., Kemp, A., Kengne, A., Keren, A., Kereselidze, M., Kesavachandran, C., Khader, Y., Khalil, I., Khan, A., Khan, E., Khang, Y., Khera, S., Khoja, T., Kieling, C., Kim, D., Kim, Y., Kissela, B., Kissoon, N., Knibbs, L., Knudsen, A., Kokubo, Y., Kolte, D., Kopec, J., Kosen, S., Koul, P., Koyanagi, A., Krog, N., Defo, B., Bicer, B., Kudom, A., Kuipers, E., Kulkarni, V., Kumar, G., Kwan, G., Lal, A., Lal, D., Laloo, R., Lam, H., Lam, J., Langan, S., Lansingh, V., Larsson, A., Laryea, D., Latif, A., Lawrynnowicz, A., Leigh, J., Levi, M., Li, Y., Lindsay, M., Lipshultz, S., Liu, P., Liu, S., Liu, Y., Lo, L., Logroscino, G., Lotufo, P., Lucas, R., Lunevicius, R., Lyons, R., Ma, S., Machado, V., Mackay, M., MacLachlan, J., Razek, H., Magdy, M., Razek, A., Majdan, M., Majeed, A., Malekzadeh, R., Manamo, W., Mandisarisa, J., Mangalam, S., Mapoma, C., Marcenes, W., Margolis, D., Martin, G., Martinez-Raga, J., Marzan, M., Masiye, F., Mason-Jones, A., Massano, J., Matzopoulos, R., Mayosi, B., McGarvey, S., McGrath, J., McKee, M., McMahan, B., Meaney, P., Mehari, A., Mehndiratta, M., Mejia-Rodriguez, F., Mekonnen, A., Melaku, Y., Memiah, P., Memish, Z., Mendoza, W., Meretoja, A., Meretoja, T., Mhimbira, F., Micha, R., Miller, T., Mirarefin, M., Misganaw, A., Mock, C., Mohammad, K., Mohammadi, A., Mohammed, S., Mohan, V., Mola, G., Monasta, L., Hernandez, J., Montero, P., Montico, M., Montine, T., Moradi-Lakeh, M., Morawska, L., Morgan, K., Mori, R., Mozaffarian, D., Mueller, U., Murthy, G., Murthy, S., Musa, K., Nachege, J., Nagel, G., Naidoo, K., Naik, N., Naldi, L., Nangia, V., Nash, D., Nejjari, C., Neupane, S., Newton, C., Newton, J., Ng, M., Ngalesoni, F., de, D., Ngirabega, J., Nguyen, Q., Nisar, M., Pete, P., Nomura, M., Norheim, O., Norman, P., Norrving, B., Nyakarahuka, L., Ogbo, F., Ohkubo, T., Ojelabi, F., Olivares, P., Olusanya, B., Olusanya, J., Opio, J., Oren, E., Ortiz, A., Osman, M., Ota, E., Ozdemir, R., Pa, M., Pandian, J., Pant, P., Papachristou, C., Park, E., Park, J., Parry, C., Parsaeian, M., Caicedo, A., Patten, S., Patton, G., Paul, V., Pearce, N., Pedro, J., Stokic, L., Pereira, D., Perico, N., Pesudovs, K., Petzold, M., Phillips, M., Piel, F., Pillay, J., Plass, D., Platts-Mills, J., Polinder, S., Pope, C., Popova, S., Poulton, R., Pourmalek, F., Prabhakaran, D., Qorbani, M., Quame-Amaglo, J., Quistberg, D., Rafay, A., Rahimi, K., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M., Rahman, M., Rahman, S., Rai, R., Rajavi, Z., Rajsic, S., Raju, M., Rakovac, I., Rana, S., Ranabhat, C., Rangaswamy, T., Rao, P., Rao, S., Refaat, A., Rehm, J., Reitsma, M., Remuzzi, G., Resnikoff, S., Ribeiro, A., Ricci, S., Blancas, M., Roberts, B., Roca, A., Rojas-Rueda, D., Ronfani, L.,

- Roshandel, G., Rothenbacher, D., Roy, A., Roy, N., Ruhago, G., Sagar, R., Saha, S., Sahathevan, R., Saleh, M., Sanabria, J., Sanchez-Niño, M., Sanchez-Riera, L., Santos, I., Sarmiento-Suarez, R., Sartorius, B., Satpathy, M., Savic, M., Sawhney, M., Schaub, M., Schmidt, M., Schneider, I., Schöttker, B., Schutte, A., Schwebel, D., Seedat, S., Sepanlou, S., Servan-Mori, E., Shackelford, K., Shaddick, G., Shaheen, A., Shahraz, S., Shaikh, M., Shakh-Nazarova, M., Sharma, R., She, J., Sheikhabaei, S., Shen, J., Shen, Z., Shepard, D., Sheth, K., Shetty, B., Shi, P., Shibuya, K., Shin, M., Shiri, R., Shiue, I., Shrimme, M., Sigfusdottir, I., Silberberg, D., Silva, D., Silveira, D., Silverberg, J., Simard, E., Singh, A., Singh, G., Singh, J., Singh, O., Singh, P., Singh, V., Soneji, S., Søreide, K., Soriano, J., Sposato, L., Sreeramareddy, C., Stathopoulou, V., Stein, D., Stein, M., Stranges, S., Stroumpoulis, K., Sunguya, B., Sur, P., Swaminathan, S., Sykes, B., Szoeki, C., Tabarés-Seisdedos, R., Tabb, K., Takahashi, K., Takala, J., Talongwa, R., Tandon, N., Tavakkoli, M., Taye, B., Taylor, H., Ao, B., Tedla, B., Tefera, W., Have, M., Terkawi, A., Tesfay, F., Tessema, G., Thomson, A., Thorne-Lyman, A., Thrift, A., Thurston, G., Tillmann, T., Tirschwell, D., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Topouzis, F., Towbin, J., Traebert, J., Tran, B., Truelsen, T., Trujillo, U., Tura, A., Tuzcu, E., Uchendu, U., Ukwaja, K., Undurraga, E., Uthman, O., Dingenen, R., van, D., A, Vasankari, T., Vasconcelos, A., Venketasubramanian, N., Vidavalur, R., Vijayakumar, L., Villalpando, S., Violante, F., Vlassov, V., Wagner, J., Wagner, G., Wallin, M., Wang, L., Watkins, D., Weichenthal, S., Weiderpass, E., Weintraub, R., Werdecker, A., Westerman, R., White, R., Wijeratne, T., Wilkinson, J., Williams, H., Wiysonge, C., Woldeyohannes, S., Wolfe, C., Won, S., Wong, J., Woolf, A., Xavier, D., Xiao, Q., Xu, G., Yakob, B., Yalaw, A., Yan, L., Yano, Y., Yaseri, M., Ye, P., Yebyo, H., Yip, P., Yirsaw, B., Yonemoto, N., Yonga, G., Younis, M., Yu, S., Zaidi, Z., Zaki, M., Zannad, F., Zavala, D., Zeeb, H., Zeleke, B., Zhang, H., Zodpey, S., Zonies, D., Zuhlke, L., Vos, T., Lopez, A. et Murray, C. (2016). Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388(10053), 1459-1544. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31012-1
- Wang, L., Basa, N.R., Shaikh, A., Luckey, A., Heber, D., St-Pierre, D.H. et Taché, Y. (2006) LPS inhibits fasted plasma ghrelin levels in rats: role of IL-1 and PGs and functional implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291(4), G611-20. DOI: 10.1152/ajpgi.00533.2005
- Wang, X. Q., Panousis, C. G., Alfaro, M. L., Evans, G. F. et Zuckerman, S. H. (2002). Interferon-gamma-mediated downregulation of cholesterol efflux and ABC1 expression is by the Stat1 pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(5), e5-9.
- Wang, Y., Gao, E., Tao, L., Lau, W. B., Yuan, Y., Goldstein, B. J., Lopez, B. L., Christopher, T. A., Tian, R., Koch, W. et Ma, X. L. (2009). AMP-activated protein kinase deficiency enhances myocardial ischemia/reperfusion injury but has minimal effect on the antioxidant/antinitrative protection of adiponectin. *Circulation*, 119(6), 835-844. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.815043
- Wang, Y., Lam, K. S., Yau, M. H. et Xu, A. (2008). Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J*, 409(3), 623-633. doi: 10.1042/BJ20071492
- Wang, Y., Lau, W. B., Gao, E., Tao, L., Yuan, Y., Li, R., Wang, X., Koch, W. J. et Ma, X. L. (2010). Cardiomyocyte-derived adiponectin is biologically active in protecting against

- myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(3), E663-670. doi: 10.1152/ajpendo.00663.2009
- Wang, Y., Wang, X., Jasmin, J. F., Lau, W. B., Li, R., Yuan, Y., Yi, W., Chuprun, K., Lisanti, M. P., Koch, W. J., Gao, E. et Ma, X. L. (2012). Essential role of caveolin-3 in adiponectin signalsome formation and adiponectin cardioprotection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(4), 934-942. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.242164
- Wei, P., Sun, F. D., Zuo, L. M., Qu, J., Chen, P., Xu, L. D. et Luo, S. Z. (2017). Critical residues and motifs for homodimerization of the first transmembrane domain of the plasma membrane glycoprotein CD36. *J Biol Chem*, 292(21), 8683-8693. doi: 10.1074/jbc.M117.779595
- Wessels, A. et Sedmera, D. (2003). Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics*, 15(3), 165-176. doi: 10.1152/physiolgenomics.00033.2003
- Whelan, R. S., Kaplinskiy, V. et Kitsis, R. N. (2010). Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*, 72, 19-44. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163111
- Wierup, N., Yang, S., McEvilly, R. J., Mulder, H. et Sundler, F. (2004). Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem*, 52(3), 301-310. doi: 10.1177/002215540405200301
- Wittes, J., Lakatos, E. et Probstfield, J. (1989). Surrogate endpoints in clinical trials: cardiovascular diseases. *Stat Med*, 8(4), 415-425.
- Woods, A., Cheung, P. C., Smith, F. C., Davison, M. D., Scott, J., Beri, R. K. et Carling, D. (1996). Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. *J Biol Chem*, 271(17), 10282-10290.
- Xing, Y., Musi, N., Fujii, N., Zou, L., Luptak, I., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. et Tian, R. (2003). Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 278(31), 28372-28377. doi: 10.1074/jbc.M303521200
- Xu, A. et Vanhoutte, P. M. (2012). Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(6), H1231-1240. doi: 10.1152/ajpheart.00765.2011
- Xu, G., Li, Y., An, W., Li, S., Guan, Y., Wang, N., Tang, C., Wang, X., Zhu, Y., Li, X., Mulholland, M. W. et Zhang, W. (2009). Gastric mammalian target of rapamycin signaling regulates ghrelin production and food intake. *Endocrinology*, 150(8), 3637-3644. doi: 10.1210/en.2009-0372
- Xu, S., Jay, A., Brunaldi, K., Huang, N. et Hamilton, J. A. (2013). CD36 enhances fatty acid uptake by increasing the rate of intracellular esterification but not transport across the plasma membrane. *Biochemistry*, 52(41), 7254-7261. doi: 10.1021/bi400914c
- Xu, W., Roos, A., Schlagwein, N., Woltman, A. M., Daha, M. R. et van Kooten, C. (2006). IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood*, 107(12), 4930-4937. doi: 10.1182/blood-2005-10-4144
- Xu, X., Ding, F., Pang, J., Gao, X., Xu, R. K., Hao, W., Cao, J. M. et Chen, C. (2012). Chronic administration of hexarelin attenuates cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(6), H703-711. doi: 10.1152/ajpheart.00257.2011

- Xu, X. B., Pang, J. J., Cao, J. M., Ni, C., Xu, R. K., Peng, X. Z., Yu, X. X., Guo, S., Chen, M. C. et Chen, C. (2005). GH-releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress-related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(4), H1643-1651. doi: 10.1152/ajpheart.01042.2004
- Xu, Z., Alloush, J., Beck, E. et Weisleder, N. (2014). A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery. *J Vis Exp*(86). doi: 10.3791/51329
- Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., Yamamoto, T., Takeshima, A., Shinmura, K., Shen, W., Fukuda, K. et Sano, M. (2013). Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 62, 24-35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.023
- Yancey, P. G., Jerome, W. G., Yu, H., Griffin, E. E., Cox, B. E., Babaev, V. R., Fazio, S. et Linton, M. F. (2007). Severely altered cholesterol homeostasis in macrophages lacking apoE and SR-BI. *J Lipid Res*, 48(5), 1140-1149. doi: 10.1194/jlr.M600539-JLR200
- Yang, F., Liu, Y. H., Yang, X. P., Xu, J., Kapke, A. et Carretero, O. A. (2002). Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol*, 87(5), 547-555.
- Yang, S., Bjorntorp, P., Liu, X. et Eden, S. (1996). Growth hormone treatment of hypophysectomized rats increases catecholamine-induced lipolysis and the number of beta-adrenergic receptors in adipocytes: no differences in the effects of growth hormone on different fat depots. *Obes Res*, 4(5), 471-478.
- Yang, X., Liaw, L., Prudovsky, I., Brooks, P. C., Vary, C., Oxburgh, L. et Friesel, R. (2015). Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep*, 17(6), 509. doi: 10.1007/s11883-015-0509-6
- Yang, X., Okamura, D. M., Lu, X., Chen, Y., Moorhead, J., Varghese, Z. et Ruan, X. Z. (2017). CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. *Nat Rev Nephrol*, 13(12), 769-781. doi: 10.1038/nrneph.2017.126
- Yang, X. P., Liu, Y. H., Rhaleb, N. E., Kurihara, N., Kim, H. E. et Carretero, O. A. (1999). Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 2), H1967-1974.
- Yang, Z. et Ming, X. F. (2014). Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol*, 5, 533. doi: 10.3389/fimmu.2014.00533
- Yao, H., Han, X. et Han, X. (2014). The cardioprotection of the insulin-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Am J Cardiovasc Drugs*, 14(6), 433-442. doi: 10.1007/s40256-014-0089-9
- Yao, L., Xue, X., Yu, P., Ni, Y. et Chen, F. (2018). Evans Blue Dye: A Revisit of Its Applications in Biomedicine. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, 7628037. doi: 10.1155/2018/7628037
- Ye, D., Lammers, B., Zhao, Y., Meurs, I., Van Berkel, T. J. et Van Eck, M. (2011). ATP-binding cassette transporters A1 and G1, HDL metabolism, cholesterol efflux, and inflammation: important targets for the treatment of atherosclerosis. *Curr Drug Targets*, 12(5), 647-660.
- Yin, H., Chu, A., Li, W., Wang, B., Shelton, F., Otero, F., Nguyen, D. G., Caldwell, J. S. et Chen, Y. A. (2009). Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using beta-

- arrestin PathHunter assay. *J Biol Chem*, 284(18), 12328-12338. doi: 10.1074/jbc.M806516200
- Yin, Y., Li, Y. et Zhang, W. (2014). The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci*, 15(3), 4837-4855. doi: 10.3390/ijms15034837
- Yipp, B. G., Robbins, S. M., Resek, M. E., Baruch, D. I., Looareesuwan, S. et Ho, M. (2003). Src-family kinase signaling modulates the adhesion of Plasmodium falciparum on human microvascular endothelium under flow. *Blood*, 101(7), 2850-2857. doi: 10.1182/blood-2002-09-2841
- Yoda-Murakami, M., Taniguchi, M., Takahashi, K., Kawamata, S., Saito, K., Choi-Miura, N. H. et Tomita, M. (2001). Change in expression of GBP28/adiponectin in carbon tetrachloride-administrated mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(2), 372-377. doi: 10.1006/bbrc.2001.5134
- Yoran, C., Covell, J. W. et Ross, J., Jr. (1973). Structural basis for the ascending limb of left ventricular function. *Circ Res*, 32(2), 297-303.
- Yoshida, Y., Jain, S. S., McFarlan, J. T., Snook, L. A., Chabowski, A. et Bonen, A. (2013). Exercise- and training-induced upregulation of skeletal muscle fatty acid oxidation are not solely dependent on mitochondrial machinery and biogenesis. *J Physiol*, 591(18), 4415-4426. doi: 10.1113/jphysiol.2012.238451
- Yoshida, Y. et Niki, E. (2006). Bio-markers of lipid peroxidation in vivo: hydroxyoctadecadienoic acid and hydroxycholesterol. *Biofactors*, 27(1-4), 195-202.
- Younis, N., Sharma, R., Soran, H., Charlton-Menys, V., Elseweidy, M. et Durrington, P. N. (2008). Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol*, 19(4), 378-384. doi: 10.1097/MOL.0b013e328306a057
- Yuasa-Kawase, M., Masuda, D., Yamashita, T., Kawase, R., Nakaoka, H., Inagaki, M., Nakatani, K., Tsubakio-Yamamoto, K., Ohama, T., Matsuyama, A., Nishida, M., Ishigami, M., Kawamoto, T., Komuro, I. et Yamashita, S. (2012). Patients with CD36 deficiency are associated with enhanced atherosclerotic cardiovascular diseases. *J Atheroscler Thromb*, 19(3), 263-275.
- Yurdagul, A., Jr., Chen, J., Funk, S. D., Albert, P., Kevil, C. G. et Orr, A. W. (2013). Altered nitric oxide production mediates matrix-specific PAK2 and NF-kappaB activation by flow. *Mol Biol Cell*, 24(3), 398-408. doi: 10.1091/mbc.E12-07-0513
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T. A., Seimon, T. A., Thorp, E., Welch, C. L., Witztum, J. L., Tabas, I. et Tall, A. R. (2010). ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. *Circ Res*, 106(12), 1861-1869. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217281
- Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J. L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., Ortiz, A. et Egido, J. (2011). Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 497841. doi: 10.1155/2011/497841
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. et Korsmeyer, S. J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 87(4), 619-628.
- Zhai, P., Sciarretta, S., Galeotti, J., Volpe, M. et Sadoshima, J. (2011). Differential roles of GSK-3beta during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion. *Circ Res*, 109(5), 502-511. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.249532

- Zhang, D., Wang, W., Zhou, D., Chen, Y., Han, L., Liu, Y., Cao, C., Zhao, H. et Liu, G. (2010). Ghrelin inhibits apoptosis induced by palmitate in rat aortic endothelial cells. *Med Sci Monit*, 16(12), BR396-403.
- Zhang, H., Cui, Z., Luo, G., Zhang, J., Ma, T., Hu, N. et Cui, T. (2013). Ghrelin attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in mice by activating the mTOR signaling pathway. *Int J Mol Med*, 32(4), 851-859. doi: 10.3892/ijmm.2013.1452
- Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K. et Hauser, C. J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 464(7285), 104-107. doi: 10.1038/nature08780
- Zhang, W., Chai, B., Li, J. Y., Wang, H. et Mulholland, M. W. (2008). Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*, 149(9), 4710-4716. doi: 10.1210/en.2008-0263
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. et Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432. doi: 10.1038/372425a0
- Zhang, Z., Biesiadecki, B. J. et Jin, J. P. (2006). Selective deletion of the NH2-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage. *Biochemistry*, 45(38), 11681-11694. doi: 10.1021/bi060273s
- Zhao, M., Liu, Y., Wang, X., New, L., Han, J. et Brunk, U. T. (2002). Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *APMIS*, 110(6), 458-468.
- Zhao, Z. Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N. P., Guyton, R. A. et Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(2), H579-588. doi: 10.1152/ajpheart.01064.2002
- Zhou, T., Prather, E. R., Garrison, D. E. et Zuo, L. (2018). Interplay between ROS and Antioxidants during Ischemia-Reperfusion Injuries in Cardiac and Skeletal Muscle. *Int J Mol Sci*, 19(2). doi: 10.3390/ijms19020417
- Zhu, W., Cheng, K. K., Vanhoutte, P. M., Lam, K. S. et Xu, A. (2008). Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)*, 114(5), 361-374. doi: 10.1042/CS20070347
- Zhu, W., Li, W. et Silverstein, R. L. (2012). Advanced glycation end products induce a prothrombotic phenotype in mice via interaction with platelet CD36. *Blood*, 119(25), 6136-6144. doi: 10.1182/blood-2011-10-387506
- Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M. et Cohen, P. L. (2012). Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol*, 189(7), 3508-3520. doi: 10.4049/jimmunol.1200662
- Zlobine, I., Gopal, K. et Ussher, J. R. (2016). Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, 1861(10), 1555-1568. doi: 10.1016/j.bbali.2016.02.011
- Zweier, J. L. et Talukder, M. A. (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 70(2), 181-190. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.02.025
- Zwirska-Korczała, K., Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., Pilc, K., Suchanek, R., Pierzchała, K., Namysłowski, G., Misiolek, M., Sadowski, K., Kato, I., Kuwahara, A. et Zabielski, R. (2007). Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol*, 58 Suppl 1, 53-64.

Statistique Canada. Tableau 13-10-0394-01. Principales causes de décès, population totale, selon le groupe d'âge et le sexe, Canada. CANSIM (base de données sur les décès) [En ligne]. Ottawa: Statistique Canada; consulté le 26 janvier 2019. Disponible : <https://www150.statcan.gc.ca/t1/tbl1/fr/tv.action?pid=1310039401>

## **Annexe : Liste des publications**

### **Publications à titre de premier auteur**

A linear fragment of unacylated ghrelin (UAG<sub>6-13</sub>) protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in mice in a growth hormone secretagogue receptor-independent manner. **Huynh DN**, Elimam H, Bessi VL, Ménard L, Burelle Y, Granata R, Carpentier AC, Ong H, Marleau S. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jan 11;9:798. PMID: 30692964

Adiponectin has a pivotal role in the cardioprotective effect of CP-3(iv), a selective CD36 azapeptide ligand, after transient coronary artery occlusion in mice. **Huynh DN\***, Bessi VL\*, Ménard L, Piquereau J, Proulx C, Febbraio M, Lubell WD, Carpentier AC, Burelle Y, Ong H, Marleau S. *FASEB J*. 2018 Feb;32(2):807-818. doi: 10.1096/fj.201700505R. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29018142 \*Contribution égale pour cet article

Cooperative role of endogenous leucotrienes and platelet-activating factor in ischaemia-reperfusion-mediated tissue injury. Bitencourt CS\*, Bessi VL\*, **Huynh DN\***, Ménard L, Lefebvre JS, Lévesque T, Hamdan L, Sohounenou F, Faccioli LH, Borgeat P, Marleau S. *J Cell Mol Med*. 2013 Dec;17(12):1554-65. doi: 10.1111/jcmm.12118. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24373549 \*Contribution égale pour cet article

### **Publications à titre de co-auteur**

Potential peptides in atherosclerosis therapy. Marleau S, Mellal K, **Huynh DN**, Ong H. *Front Horm Res*. 2014;43:93-106. doi: 10.1159/000360568. Epub 2014 Jun 10. Review. PMID: 24943301

EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice. Bessi VL, Labbé SM, **Huynh DN**, Ménard L, Jossart C, Febbraio M, Guérin B, Bentourkia M, Lecomte R, Carpentier AC, Ong H, Marleau S. *Cardiovasc Res*. 2012 Oct 1;96(1):99-108. doi: 10.1093/cvr/cvs225. Epub 2012 Jul 10. PMID: 22787133