

Université de Montréal

**Étude de la fonction vasculaire et du remodelage  
cardiaque avant l'établissement de l'obésité et de la  
dyslipidémie chez les rats femelles Sprague-Dawley  
recevant une diète riche en gras**

par

Marie-Claude Aubin

Département de Pharmacologie, Université de Montréal

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Doctorat

en Pharmacologie

Avril, 2009

© Marie-Claude Aubin, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude de la fonction vasculaire et du remodelage  
cardiaque avant l'établissement de l'obésité et de la  
dyslipidémie chez les rats femelles Sprague-Dawley  
recevant une diète riche en gras**

présentée par :

Marie-Claude Aubin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Denis Deblois, président-rapporteur  
Louis P. Perrault, directeur de recherche  
Angelino Calderone, co-directeur  
Jean-Philippe Gratton, membre du jury  
Pedro D'Orléans-Juste, examinateur externe

## RÉSUMÉ

---

Des lacunes existent au niveau des connaissances concernant les modifications cardiovasculaires manifestées avant l'établissement d'obésité et en absence d'hyperlipidémie. Dans cette optique, la présente étude a testé l'hypothèse générale qui stipule que l'administration d'une diète riche en gras pour une période de 8 semaines chez les rats femelles influence négativement la fonction et le remodelage cardiaque, avant le développement de l'obésité et en absence d'hyperlipidémie et d'hyperglycémie. Afin de répondre à cette problématique, des rats femelles Sprague-Dawley ont été assignés à une diète standard (SD; 12,5% lipides, kcal) ou riche en gras (HF; 42% lipides, kcal) pour une période de 8 semaines. Cette durée était insuffisante pour induire le développement d'une dyslipidémie ou une augmentation significative de la masse corporelle chez les animaux HF ( $329 \pm 14$ g) comparativement aux rates SD ( $300 \pm 10$ g). Toutefois, une hypertension artérielle s'est développée chez les rates HF ( $130 \pm 4$  vs  $108 \pm 6$ mmHg,  $p < 0,05$ ), accompagnée d'une altération des relaxations aortiques dépendantes de l'endothélium (relaxation maximale :  $22 \pm 5\%$  versus  $53 \pm 8\%$ , pour les animaux HF et SD respectivement,  $p < 0,05$ ). L'administration orale chronique de l'antioxydant resvératrol (RES;  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{jr}^{-1}$ ) a prévenu le développement de ces altérations pathologiques, attestant d'une implication du stress oxydant. Au niveau cardiaque, le RES n'a toutefois pas inhibé le développement de fibrose périvasculaire secondaire à l'administration de la diète riche en gras.

Suite à une insulte d'ischémie-reperfusion, la taille (SD :  $0,29 \pm 0,09$  versus HF :  $0,32 \pm 0,13$  cm), l'épaisseur (SD :  $0,05 \pm 0,02$  versus HF :  $0,06 \pm 0,01$  cm) et le contenu en collagène  $\alpha 1$  type 1 (SD :  $0,021 \pm 0,04$  versus HF :  $0,20 \pm 0,04$  unités arbitraires/ $\text{mm}^2$ ) de la cicatrice du cœur infarci des rats HF étaient comparables au cœur infarci des rats SD. Malgré ces similitudes, le taux de décès était significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevé chez les rats HF (56%) comparativement aux rats SD (5%). L'approche par électrophysiologie a démontré que l'administration de la diète riche en gras était associée à une augmentation ( $p < 0,05$ ) du nombre d'extrasystoles ventriculaires induites. Cette élévation de l'incidence était associée à une hyperinnervation sympathique fonctionnelle, tel que démontré par une élévation ( $p < 0,05$ ) de la densité des fibres neurofilament-M (HF :  $2830 \pm 250$  versus SD :

2020±260  $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ) et de la protéine de l'hydroxylase de la tyrosine. La fonctionnalité des jonctions intercellulaires était également atteinte, caractérisée par une latéralisation et internalisation de connexine 43 ainsi qu'une diminution de l'expression de connexine 40 au niveau des disques intercalaires.

Ainsi, avant l'établissement de l'obésité et d'une dyslipidémie, les rats femelles modestement hypertendus présentent un phénotype arythmogénique cardiaque en partie dû à une hyperinnervation sympathique et une expression altérée concomitante de la distribution et de l'expression des jonctions intercellulaires. L'absence de symptômes cliniques d'obésité dans la présente étude ne fournit aucun indice au clinicien quant à la susceptibilité accrue aux arythmies ventriculaires. Ainsi, en présence d'une hypertension artérielle modérée chez un patient non-obèse, une mesure de l'activité sympathique par la quantification des niveaux circulants de catécholamines pourrait être bénéfique afin de détecter les patients à risque de mort subite.

**Mots-clés :** Hypertension artérielle, Réactivité vasculaire, Fibrose cardiaque, Ischémie-reperfusion, Arythmie ventriculaire, Remodelage cicatriciel, Système nerveux autonome

## ABSTRACT

---

Knowledge is insufficient regarding cardiovascular modifications occurring prior to the development of overt obesity and dyslipidemia. In this regard, the present project aimed at testing the hypothesis stipulating that the administration of a high fat diet for an 8-week period in female rats can adversely influence cardiac function and remodeling prior to the development of overt obesity, and in the absence of hyperlipidemia and hyperglycaemia. To directly examine these issues, normal female Sprague-Dawley rats were fed a standard (SD; 12.5% lipid, kcal) or a high-fat diet (HF; 42% lipids, kcal) for 8 weeks. This regimen was insufficient to induce a significant gain in body mass in HF rats ( $329\pm 14\text{g}$ ) as compared to SD rats ( $300\pm 10\text{g}$ ), or any variation in the lipid profile. By contrast, systemic arterial hypertension developed in high fat fed rats ( $130\pm 4\text{mmHg}$  versus SD,  $108\pm 6\text{mmHg}$ ,  $p<0.05$ ), additionally to a significant decrease in acetylcholine-mediated maximal relaxation of isolated aortic rings (HF,  $22\pm 5\%$ ) compared to rats fed a standard diet ( $53\pm 8\%$ ,  $p<0.05$ ). Chronic oral administration of the antioxidant resveratrol (RES;  $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) prevented the development of both pathological alterations, attesting to the implication of oxidative stress. However, it failed to attenuate the perivascular fibrosis that developed following the administration of the high-fat diet.

Following ischemia/reperfusion injury, scar length (SD,  $0.29\pm 0.09$  versus HF,  $0.32\pm 0.13\text{ cm}$ ), thickness (SD,  $0.05\pm 0.02$  versus HF,  $0.06\pm 0.01\text{ cm}$ ) and collagen  $\alpha_1$  type 1 content (SD,  $0.21\pm 0.04$  versus HF,  $0.20\pm 0.04$  arbitrary units/ $\text{mm}^2$ ) in the infarcted heart of rats fed a high fat diet were similar to infarcted normal rats. Despite these findings, the rate of death was significantly increased ( $p<0.05$ ) in female rats fed a high fat diet (56%) compared to rats fed a standard diet (5%). An electrophysiology approach revealed that normal female rats fed a high fat diet had an increased incidence ( $p<0.05$ ) of induced ventricular extrasystoles. In addition, these hearts presented a functional sympathetic hyperinnervation, as reflected by the increased density of neurofilament-M immunoreactive fibres (SD,  $2020\pm 260$  versus HF,  $2830\pm 250\ \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ;  $p<0.05$ ) and increased protein expression of tyrosine hydroxylase. The gap junction function was also impaired, characterized by lateralization and internalization of connexin 43, and a decreased expression of connexin 40 in intercalated discs of rats fed a high fat diet.

Thus, prior to the development of overt obesity and dyslipidemia, female rats with modest hypertension exhibit an arrhythmogenic cardiac phenotype due in part to sympathetic hyperinnervation and a concomitant aberrant pattern of gap junctional protein expression and distribution. The lack of significant clinical manifestations of obesity in the present study does not enable clinicians to suspect the increased susceptibility to ventricular arrhythmias. Hence, in presence of modest hypertension in a non-obese patient, evaluation of the sympathetic activity by the assessment of circulating catecholamine could be helpful in detecting patients at high risk for sudden death.

**Keywords :** Arterial hypertension, Vascular reactivity, Cardiac fibrosis, Ischemia-reperfusion, Ventricular Arrhythmias, Scar remodeling, Autonomic nervous system

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE DEUXIÈME : PHYSIOLOGIE CARDIOVASCULAIRE.....</b>	<b>3</b>
<b>1. SOURCES ÉNERGÉTIQUES MYOCARDIQUES.....</b>	<b>3</b>
Voies exogène et endogène des acides gras .....	3
Utilisation des métabolites .....	5
Régulation de l'utilisation des métabolites.....	6
<b>2. FONCTION ET RYTHME CARDIAQUES.....</b>	<b>10</b>
Rythme et fréquence cardiaques.....	10
Contractilité myocardique .....	13
<b>3. RÉGULATION DE LA PRESSION ARTÉRIELLE SYSTÉMIQUE .....</b>	<b>17</b>
Mécanismes réflexes .....	17
Système nerveux autonome.....	19
Système rénine-angiotensine-aldostérone .....	20
<b>4. FONCTION ENDOTHÉLIALE.....</b>	<b>26</b>
Le tonus vasomoteur .....	26
Autres fonctions endothéliales .....	32
<b>5. RÉGULATION DES ESPÈCES RÉACTIVES OXYGÉNÉES.....</b>	<b>34</b>
Principales espèces réactives oxygénées .....	34
Sources enzymatiques des espèces réactives oxygénées .....	37
Antioxydants enzymatiques endogènes.....	39
Rôles physiologiques des espèces réactives oxygénées .....	41
Stress oxydant : Rôles pathologiques des espèces réactives oxygénées.....	41

<b>CHAPITRE TROISIÈME : ALTÉRATIONS PATHOLOGIQUES RELIÉES À L'OBÉSITÉ .....</b>	<b>44</b>
<b>1. DYSLIPIDÉMIE ET ALTÉRATIONS MÉTABOLIQUES.....</b>	<b>44</b>
<b>2. ALTÉRATIONS VASCULAIRES .....</b>	<b>46</b>
Hypertension artérielle systémique .....	46
Athérosclérose.....	50
<b>3. INFARCTUS DU MYOCARDE.....</b>	<b>52</b>
1. Remodelage cicatriciel.....	52
2. Remodelage cardiaque.....	54
3. Formation cicatricielle chez les gens obèses .....	54
<b>4. ARYTHMIES CARDIAQUES POST-INFARCTUS.....</b>	<b>56</b>
1. Hyperinnervation sympathique.....	56
2. Remodelage électrique.....	57
3. Facteurs de prédisposition chez les gens obèses.....	59
<b>CHAPITRE QUATRIÈME : TRAITEMENTS ANTIOXYDANTS CONTRE L'OBÉSITÉ ET LES ALTÉRATIONS PATHOLOGIQUES ASSOCIÉES .....</b>	<b>62</b>
Resvératrol .....	62
Résultats cliniques des traitements antioxydants.....	69
<b>CHAPITRE CINQUIÈME : HYPOTHÈSES ET BUTS .....</b>	<b>72</b>
<b>CHAPITRE SIXIÈME : PREMIÈRE ÉTUDE .....</b>	<b>74</b>
<b>CHAPITRE SEPTIÈME : DEUXIÈME ÉTUDE.....</b>	<b>100</b>
<b>CHAPITRE HUITIÈME : DISCUSSION .....</b>	<b>125</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>149</b>

## *LISTE DES TABLEAUX*

---

### CHAPITRE SIXIÈME

- Table I.** Body and heart weight in female rats fed a standard or high fat diet and the effect of resveratrol.
- Table II.** The plasma lipid profile in female rats fed a standard or high-fat diet and the effect of resveratrol.
- Table III.** Mean arterial pressure and left ventricular contractility in female rats fed a standard or high-fat diet and the effect of resveratrol.
- Table IV.** Cardiac response to dobutamine infusion (5 µg/kg/min) in female rats fed a standard or high-fat diet and the effect of resveratrol.
- Table V.** mRNA expression in the left ventricle of female rats fed a standard or high-fat diet.
- Table VI.** Left ventricular and perivascular collagen  $\alpha 1$  type 1 content in rats fed a standard or high-fat diet and the effect of resveratrol.

### CHAPITRE SEPTIÈME

- Table I.** Body and heart weights in female rats fed a standard or high fat diet and subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury.
- Table II.** MAP and left ventricular contractility in female rats fed a standard or high fat diet and subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury.
- Table III.** Lipid profile in female rats fed a standard or high fat diet and subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury.
- Table IV.** Scar planimetry and collagen content in female rats fed a standard or high fat diet and subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury.
- Table V.** Effective ventricular refractory period in female rats fed a standard or a high fat diet.
- Supplemental Table.** MAP and left ventricular contractility in female rats fed a standard or high fat diet.

# *LISTE DES FIGURES*

---

## CHAPITRE DEUXIÈME

- Figure 1.** Voie endogène et exogène du métabolisme des acides gras.
- Figure 2.** Métabolisme des acides gras libres et du glucose dans les cardiomyocytes.
- Figure 3.** Synthèse endothéliale du monoxyde d'azote.
- Figure 4.** Synthèse des espèces réactives oxygénées

## CHAPITRE QUATRIÈME

- Figure 5.** Resvératrol ou *trans*-3,4',5-trihydroxystilbène

## CHAPITRE SIXIÈME

- Figure 1.** Sirius red staining.
- Figure 2.** Acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings and the *in vitro* effect of resveratrol administration.
- Figure 3.** Sodium nitroprusside-mediated relaxation of aortic rings.
- Figure 4.** Acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings and the *in vivo* effect of resveratrol administration.

## CHAPITRE SEPTIÈME

- Figure 1.** Ventricular arrhythmias during coronary artery ligation.
- Figure 2.** Tyrosine hydroxylase and connexin-43 protein expression and phosphorylation.
- Figure 3.** Expression and distribution of gap junctional proteins.

## *LISTE DES ABRÉVIATIONS*

---

ACh : Acétylcholine  
ADRs : Récepteurs adrénergiques  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
AMPK : Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate  
Ang : Angiotensine  
AT<sub>1</sub>: Récepteur de l'angiotensine de sous-type 1  
ATP : Adénosine triphosphate  
BH<sub>4</sub>: Tétrahydrobioptérine  
Ca<sup>2+</sup>: Calcium  
CE : Cellules endothéliales  
CML : Cellules musculaires lisses  
CoA : Coenzyme A  
COX : Cyclooxygénase  
CPT : Carnitine palmitoyltransférase  
Cx : Connexine  
DAG : Diacylglycérol  
ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine  
EDHF : Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium  
eNOS : Synthétase endothéliale du monoxyde d'azote  
ET : Endothéline  
FAT : Transporteur des acides gras libres  
GAP : Protéine associée à la croissance  
GLUT : Transporteur du glucose  
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique  
GFAP : Protéine acide fibrillaire des cellules gliales  
GPx : Peroxydase du glutathion  
HDL : Lipoprotéines de haute densité  
HIF : Facteur induit par l'hypoxie  
iNOS : Synthétase inductible du monoxyde d'azote

IP<sub>3</sub>: Inositol triphosphate  
I/R : Ischémie-reperfusion  
K<sup>+</sup> : Potassium  
LDL: Lipoprotéines de faible densité  
M<sub>2</sub> : Récepteur muscarinique de type 2  
MMP : Métalloprotéinases matricielles  
Na<sup>+</sup> : Sodium  
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit  
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit  
NCX : Échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
NGF : Facteur de croissance neuronale  
nNOS : Synthétase neuronale du monoxyde d'azote  
NO: Monoxyde d'azote  
PDH : Déshydrogénase du pyruvate  
PGI<sub>2</sub>: Prostacycline  
PPAR: Récepteur gamma activé par le proliférateur du peroxydome  
PSA-NCAM : Forme polysialique des molécules d'adhésion des cellules neurales  
RES : Resvératrol  
SERCA : Ca<sup>2+</sup> ATPase du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique  
SNC : Système nerveux central  
SNRT : Temps de recouvrement sinusal  
SOD : Dismutase du superoxyde  
TGF : Facteur de croissance transformant  
TH : Hydroxylase de la tyrosine  
TIMP : Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases de la matrice  
VEGF : Facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires  
VLDL : Lipoprotéines de très faible densité

*À jamais je resterai sans réponse, à savoir  
pourquoi il a fallu qu'Il vous rappelle à Lui si tôt...  
Papa et Dave, je vous aimerai éternellement*

## REMERCIEMENTS

---

Je voudrais tout d'abord remercier mes deux mentors qui m'ont guidé tout au cours de mes études doctorales. Dr Perrault, je tiens à vous exprimer ma gratitude de m'avoir donné la chance de poursuivre mes études graduées dans votre laboratoire. Je vous suis reconnaissante pour toutes les opportunités que vous m'avez présentées, de la confiance que vous m'avez témoignée et de la liberté d'action que vous m'avez offerte. Par vos judicieux conseils, vous m'avez énormément fait grandir au cours des 6 années que j'ai passées dans le laboratoire. Je vous remercie également de m'avoir permis de voyager autour du globe afin d'assister à de nombreux congrès et surtout, merci pour tous ces «*lab meetings*» mémorables. Lino, je suis honorée d'avoir été une de tes FGS. Mon progrès réalisé à tes côtés est inestimable. Tu m'as beaucoup apporté, tant au niveau des études qu'au niveau personnel. Tu es un patron sensible, à l'écoute de tes étudiants et cette valeur fera que tu seras toujours autant aimé de tes proches. Merci.

Après ce que j'ai connu auprès de vous les filles, comment espérer avoir une si belle ambiance et complicité dans mes emplois ultérieurs? Vous avez mis la barre haute! Alex, tu es une personne fantastique et ta présence m'a beaucoup manqué beaucoup au labo cette dernière année. Tu es une petite pince sans-rire qui réussit à coup sûr à m'accrocher un sourire. Je te souhaite énormément de succès dans tes études et montre aux français que les québécoises savent de quoi elles parlent quand il s'agit de CYPs méga pussy! Marie-Pierre, tu as passé la dernière année si loin de moi! Vive la technologie pour garder contact (et pour jouer au tétis)! Je n'ai malheureusement pas vraiment eu la chance de travailler avec toi autant qu'au cours de ma maîtrise mais sache que je garde toujours en tête que tu es la compétence incarnée. Stéphanie, la fan numéro 1 de KenLee et ma 'pusher' hors paire de bonbons de la boutique souvenirs!!! Tu es la personne la plus attentionnée que je connaisse. Tu es une collègue de travail de rêve et je te remercie pour tout, tout, tout. Jess, la femme bionique qui va révolutionner la chirurgie cardiaque. Je te souhaite le meilleur des succès dans ce monde d'homme. Je garde d'excellents souvenirs (de ce que je me souviens) des congrès passés avec toi! Je ne verrais plus jamais du même œil les petits bâtons normalement utilisés pour brasser le café... Je voudrais également remercier Bob, Hugues et Louis, non seulement pour votre aide indispensable mais également pour tous les bons moments que j'ai passés à travailler avec vous. Vous êtes mes trois hommes au labo à qui je dois beaucoup.

Ma chère Isa, mon idole des bèches au ralenti... Tu es vraiment la meilleure amie que toute personne puisse souhaiter avoir. Je te remercie énormément de toujours être là pour moi : ton support, tes encouragements, ton écoute, ta présence, etc me sont indispensables. Val et Édith, je vous remercie pour tous les beaux moments que j'ai la chance de vivre à vos côtés. Votre amitié compte tellement pour moi et mon désir le plus cher est de vous garder à tout jamais dans ma vie. Je tiens également à remercier Ju, Isa et Eve, Caro, Ju, Eli, Véro. Je n'ai que d'éloge à faire à votre sujet. Je vous aime énormément. C'est pour quand notre prochain souper de sacoques?

J'ai débuté mes études graduées à l'Institut de Cardiologie de Montréal parce que le cœur représentait un mystère pour moi. J'ai acquis un lot inestimable de connaissances

relativement à cet organe mais certaines questions le concernant resteront à jamais sans réponse. Pourquoi a-t-il fallu que celui à mon petit papa d'amour et celui à mon frère adoré Dave sortent du droit chemin, qu'ils s'emballent au point de les conduire au ciel? Votre absence a créé et créera à jamais un vide en moi. Je vous aime et compte sur vous pour m'accueillir là-haut dans plusieurs dizaines d'années, j'ai excessivement hâte de vous serrer dans mes bras. Ne t'inquiète pas Dave, on va propager ta chanson de gan sa ham ni da, c'est un hit assuré, tu es le meilleur! Et toi papa, tu seras à jamais mon modèle. À vous mes deux anges, je dédie cet ouvrage.

Maman, je t'aime plus que tout. Si tu savais à quel point tu as été une inspiration pour moi. À quel point tu m'as insufflé une force pour continuer, malgré les épreuves que nous avons vécues ces dernières années. Pour tout l'amour et le soutien que tu m'as apportés, je te remercie énormément. Nin the king, mon frerot adoré, mon conseiller en or, mon oreille attentive. La distance ne viendra jamais à bout de la force qui nous unis. Je suis fier de toi, dans tous tes accomplissements et crois-moi, on va surmonter ensemble cette horreur qui habite nos cœurs. Mon petit Zack, tu es un rayon de soleil dans ma vie et tout ce que j'espère est que Dave aie eu assez de temps pour te transmettre une parcelle de sa personnalité merveilleuse pour que tu nous le fasses revivre. Tu es un petit bonhomme merveilleux et le meilleur neveu qu'une tante peut avoir, je t'adore! Annick et Issa, vous êtes deux belle-sœur de rêve. Votre entrée dans la vie à mes frères leur a tant apporté et c'est entre autre pourquoi je vous serais éternellement reconnaissante. En dernier lieu mais non le moindre, je tiens à remercier Francis, mon amour. Et selon tes désirs, je vais même te remercier deux fois plutôt qu'une. Merci d'avoir subi mes *légers* manques de patience et mes *minimes* sautes d'humeur. Je te jure, je vais changer.... Ta présence à mes côtés m'apporte tant, à un point que tu ne peux même pas imaginer. J'espère de tout cœur vivre de nombreuses années avec toi. Je t'aime (mais pas ton hockey).

# CHAPITRE PREMIER :

## INTRODUCTION

---

Dans les temps anciens, l'obésité chez la femme était positivement associée à la richesse et à la fertilité. Par contre, c'est l'envers de la médaille qui nous est présenté à ce jour, compte tenu des nombreux méfaits reliés à la surcharge pondérale. Malgré cette prise de conscience récente, l'excès de poids (pré-obésité) et l'obésité représentent une menace croissante pour la santé occidentale, atteignant des proportions respectives de 66 % et 33 % aux États-Unis [1]. Que l'origine soit acquise ou génétique, l'obésité est associée à divers états pathologiques reliés au métabolisme, incluant entre autres la dyslipidémie, l'intolérance au glucose et le diabète de type II. De plus, chez les patients diagnostiqués avec un syndrome métabolique, l'hypertension artérielle et les maladies des artères coronaires sont fréquentes, augmentant considérablement le risque subséquent d'infarctus du myocarde [2].

Des modèles d'obésité ont été développés chez les animaux, employant divers types de diète telles que riche en glucose, riche en gras, riche en calorie et occidentale (combinée glucose/gras). Ces modèles fournissent une méthode permettant de déterminer les nombreux mécanismes sous-jacents contribuant au développement des événements cardiovasculaires. À titre d'exemple, une étude réalisée par Dobrian et al. [3] a démontré que l'augmentation de la pression artérielle systolique chez les rats obèses hypercholestérolémiques peut être reliée à l'augmentation des niveaux de rénine plasmatique. Également, l'augmentation du stress oxydant représente un événement contribuant au développement de l'hypertension chez les patients obèses et les modèles expérimentaux d'obésité. De fait, l'augmentation de la production vasculaire d'anions superoxyde présente un impact négatif sur l'activité de la synthétase du monoxyde d'azote (eNOS), diminuant concomitamment la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) et contribuant ainsi à la dysfonction endothéliale [4].

Les méfaits de l'obésité ont également été approfondis au niveau cardiaque puisque que l'induction d'une insulte d'ischémie-reperfusion (I/R) est associée à une malformation cicatricielle. La grandeur de l'infarctus est dramatiquement plus élevée comparativement

aux rats ayant reçu une diète standard et le contenu est moins important en fibres de collagène de remplacement, attestant une faiblesse de la paroi cicatricielle [5]. En plus d'un remodelage cardiaque inapproprié dans les modèles d'obésité impliquant une insulte d'I/R, une susceptibilité accrue aux arythmies ventriculaires est présente. Les rats ayant reçu une diète riche en gras sont prédisposés à la repolarisation ventriculaire hétérogène, potentiellement reliée à un tonus anormal du système nerveux autonome [6].

Malgré la relation univoque entre l'obésité établie et les maladies cardiovasculaires, il demeure toutefois indéterminé si la dysfonction endothéliale vasculaire ou le remodelage cardiaque inadapté surviennent avant l'établissement d'un gain significatif de la masse corporelle ou de changement au niveau du profil lipidique. Dans cette optique, la présente étude a testé les hypothèses suivantes : suite à l'ingestion d'une diète riche en gras, 1) les relaxations vasculaires dépendantes de l'endothélium sont altérées, concomitamment à une augmentation de la pression artérielle systolique, 2) le stress oxydant est impliqué dans le développement des manifestations néfastes cardiovasculaires puisqu'un traitement antioxydant chronique avec le resvératrol (RES) peut limiter leur évolution, 3) le remodelage cicatriciel suite à une insulte d'I/R est inadapté, tant au niveau de la taille que du contenu en fibres de collagène  $\alpha 1$ , et finalement 4) la prédisposition aux arythmies ventriculaires est significativement plus élevée comparativement aux rats femelles ayant reçu une diète standard.

# *CHAPITRE DEUXIÈME :*

## *PHYSIOLOGIE CARDIOVASCULAIRE*

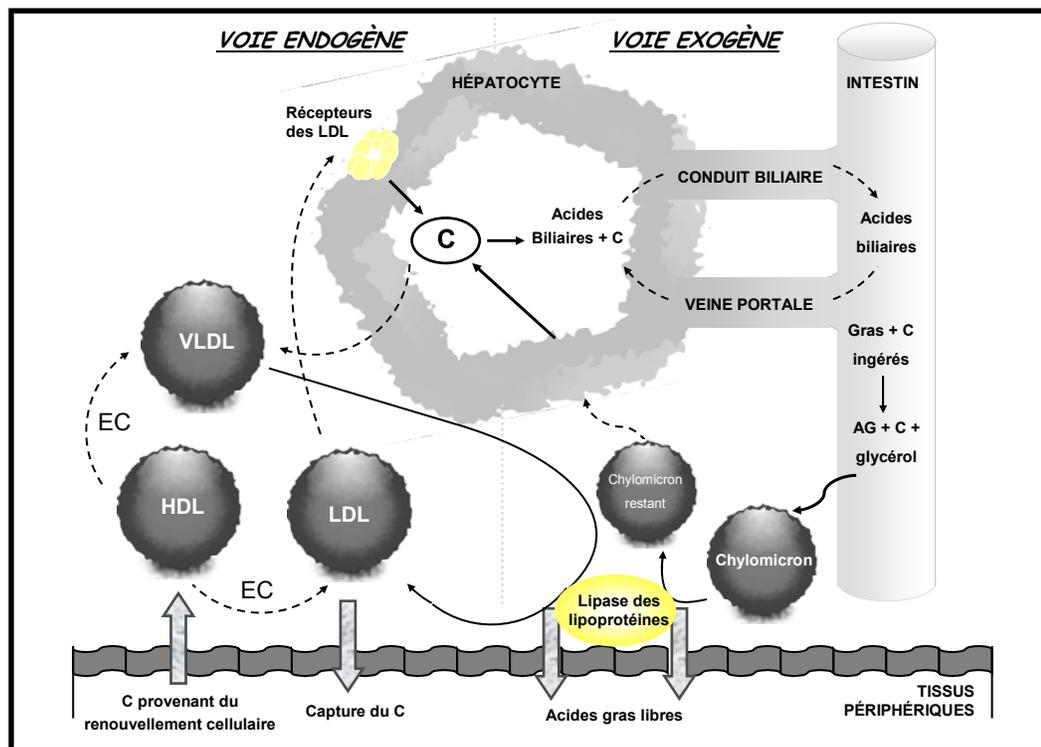
---

### **1. SOURCES ÉNERGÉTIQUES MYOCARDIQUES**

Les muscles squelettiques et cardiaque tirent leur énergie métabolique de l'adénosine triphosphate (ATP) pour la performance contractile. Cette ATP, dérivée du métabolisme oxydatif mitochondrial, provient principalement des acides gras de longue chaîne (70 %) et, minoritairement, du glucose et autres glucides dont le lactate [7]. Le glucose est absorbé directement au niveau de la paroi intestinale, séquentiellement par un co-transporteur du sodium/glucose suivi d'un canal, pour ensuite être transporté intact dans le plasma jusqu'à son site d'utilisation [8]. Par contre, le transport des lipides est un cheminement plus complexe. Afin d'être utilisés pour leur ATP, les lipides et le cholestérol sont transportés dans la circulation sanguine sous forme de complexes macromoléculaires appelés lipoprotéines [9]. Ces dernières sont composées d'un noyau central hydrophobe (triglycérides et esters de cholestérol) encadré dans un manteau hydrophile de substances polaires (phospholipides, cholestérol et apolipoprotéines). Quatre principales classes de lipoprotéines existent, différant selon la proportion relative de lipides et du type d'apolipoprotéine. Ainsi, elles varient en taille et en densité, permettant leur séparation à l'ultracentrifugation : lipoprotéines de haute densité (HDL), de faible densité (LDL), de très faible densité (VLDL) et les chylomicrons. Chacune de ces classes possède un rôle précis au niveau du transport des lipides dans la circulation, tant pour la voie endogène qu'exogène.

**VOIES EXOGÈNE ET ENDOGÈNE DES ACIDES GRAS** Le cholestérol et les triglycérides provenant de la nourriture sont absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal et sont ensuite transportés dans la lymphe sous forme de chylomicrons [10]. Ces derniers passent ensuite au niveau plasmatique et transfèrent des capillaires vers les tissus adipeux ou musculaires, incluant le muscle cardiaque [9]. À la surface de la paroi des tissus périphériques, le noyau de triglycérides est clivé par la lipoprotéine lipase et les acides gras

libres résultants sont ensuite absorbés par les tissus (Figure 1) [11]. Le chylomicron restant qui possède encore son plein contenu en esters de cholestérol se lie au niveau des récepteurs hépatiques et subit une endocytose. Le cholestérol est ainsi libéré dans les cellules hépatiques pour être entreposé, oxydé en acides biliaires ou sécrété, sous forme inchangée, dans la bile. Alternativement, il peut entrer dans la voie endogène du transport des lipides sous forme de VLDL [12].



**FIGURE 1.** Voie endogène et exogène du métabolisme des acides gras. AG : acides gras, C : cholestérol, EC : esters de cholestérol, HDL : lipoprotéines de haute densité, LDL : lipoprotéines de faible densité, VLDL : lipoprotéines de très faible densité. Adapté de Rang HP. *Pharmacology*. 5th ed, 2003.

Dans la voie endogène, le cholestérol et les triglycérides nouvellement synthétisés sont transportés du foie aux muscles et tissus adipeux sous forme de VLDL (Figure1). À ce niveau, les triglycérides sont hydrolysés et les acides gras libres générés entrent dans les tissus [12]. Au cours de ce processus, les lipoprotéines deviennent de plus en plus petites, tout en conservant leur contenu en esters de cholestérol. Elles deviennent ultimement des

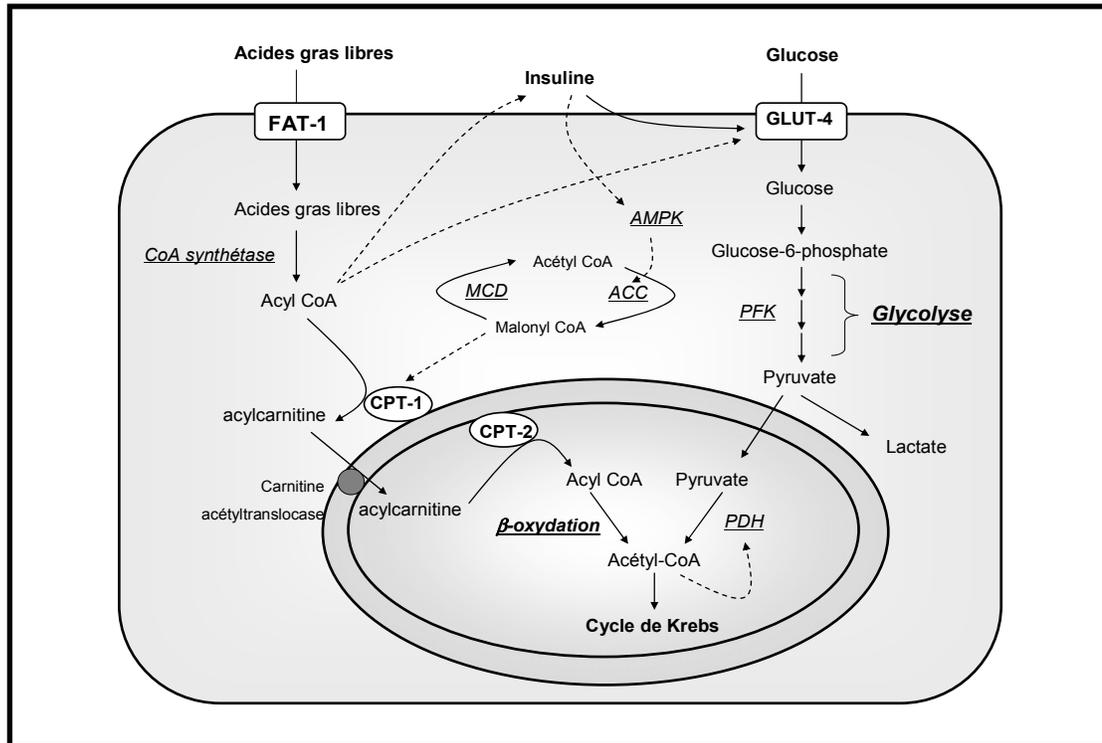
LDL, une source de cholestérol pour la synthèse des stéroïdes et des acides biliaires. Le cholestérol provenant du renouvellement cellulaire peut également retourner dans le plasma sous forme de HDL. Il subit par la suite une estérification avec des acides gras de longue chaîne et est subséquemment transféré aux particules de VLDL ou LDL [12].

**UTILISATION DES MÉTABOLITES** Les cardiomyocytes oxydent les acides gras libres dérivés du plasma et de la dégradation des réserves intracellulaires de triglycérides, ainsi que le pyruvate qui provient de la déshydrogénase du lactate ou de la glycolyse. Le taux d'oxydation de ces métabolites énergétiques, soient les acides gras et le pyruvate, est intimement lié à la fréquence de contraction cardiaque [7].

**1. Bêta-oxydation des acides gras libres** Au niveau des cardiomyocytes, les acides gras libres sont transportés dans le cytoplasme par le transporteur des acides gras (FAT-1) pour ensuite être convertis en acyl-coenzyme A (CoA) par la synthétase CoA des acides gras (Figure 2). La carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT-1; localisée sur la membrane mitochondriale externe) est responsable de l'ajout de la carnitine au groupement acyl-CoA. L'acylcarnitine résultante est transférée dans la mitochondrie par le transporteur carnitine-acylcarnitine [13, 14]. La CPT-2; localisée sur la membrane mitochondriale interne, reconvertit le produit en acyl-CoA, et ce dernier peut ensuite subir la bêta-oxydation. Au cours de ce processus, la molécule d'acide gras est dégradée, permettant la libération progressive d'acétyls-CoA [15]. Ce segment contenant 2 carbones entre ensuite dans le cycle de Krebs pour générer l'ATP (Figure 2).

**2. Glycolyse** La capture du glucose extracellulaire est régulée par le gradient transmembranaire de glucose, ainsi que par la concentration et l'activité des transporteurs. Deux isoformes de ce dernier ont été identifiés au niveau de la membrane plasmique du myocarde : transporteur du glucose (GLUT) 1 et 4, le type 4 étant prédominant [16]. Ainsi, suite à son entrée dans les cardiomyocytes, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase. Subséquemment, diverses enzymes entrent en jeu dans le processus de la glycolyse pour aboutir en la formation du pyruvate [17]. Ce dernier entre

dans la mitochondrie et, en condition aérobie, est décarboxylé en acétyl-CoA par la déshydrogénase du pyruvate. Finalement, l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs pour y induire la libération d'ATP (Figure 2). Toutefois, en condition ischémique, le pyruvate est converti de manière réversible en lactate par la lactico-déshydrogénase cytosolique [17].



**FIGURE 2.** Métabolisme des acides gras libres et du glucose dans les cardiomyocytes. ACC : Carboxylase de l'acétyl CoA, AMPK : Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate, CPT : Carnitine palmitoyltransférase, FAT-1 : Transporteur des acides gras libres, GLUT-4 : Transporteur du glucose, MCD : Décarboxylase du malonyl CoA, PDH : Déshydrogénase du pyruvate, PFK : Phosphofructokinase-1. Les flèches pointillées ( - - - - -> ) représentent des mécanismes d'inhibition.

**RÉGULATION DE L'UTILISATION DES MÉTABOLITES** La régulation du métabolisme myocardique est complexe, étant à la fois liée aux niveaux de substrats plasmatiques et d'hormones, au flot coronarien, à l'état inotropique et au statut nutritionnel du tissu.

**1. Oxygénation et flot coronarien** L'oxygène joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique du myocarde, étant impliqué dans l'oxydation des acides gras libres et du glucose [18]. Puisque le flot coronarien est intimement relié à la consommation myocardique en oxygène, ces deux derniers varient en fonction de la demande, pouvant augmenter de l'ordre d'environ 100 fois lors du passage de l'état de repos à exercice maximal [19]. Les principaux éléments physiologiques impliqués dans la régulation du flot coronarien comprennent 1) les facteurs humoraux et neuronaux (Section *Régulation de la pression artérielle*, p.17), 2) les métabolites vasculaires (Section *Fonction endothéliale*, p.26), et 3) les facteurs physiques. En effet, en cours de systole, la pression exercée par le myocarde sur les vaisseaux intramyocardiques excède la pression de perfusion, ce qui réduit, voire interrompt le débit sanguin. Ainsi, la perfusion coronaire s'effectue essentiellement pendant la diastole ventriculaire [20].

**2. Acides gras libres versus glucose** Dans la plupart des cas, les niveaux d'acides gras libres sont les principaux régulateurs de l'utilisation myocardique du glucose et du lactate. De fait, l'oxydation des acides gras libres est responsable de l'inhibition du catabolisme musculaire du glucose, survenant dans un premier temps par une inhibition de la phosphofructokinase 1 (Figure 2). Plus précisément, l'augmentation du citrate généré au cours du cycle de Krebs inhibe la phosphofructokinase 1, enzyme impliquée dans le processus de glycolyse [21]. Dans un deuxième temps, une haute fréquence d'oxydation des acides gras libres se traduit par une élévation des concentrations de nicotinamide adénine dinucléotide et d'acétyl CoA dans la matrice mitochondriale. Ceci active la kinase de la déshydrogénase du pyruvate (PDH), une enzyme impliquée dans l'inhibition de l'activité de la PDH et de l'oxydation subséquente du pyruvate [22]. Dans un dernier temps, l'oxydation des acides gras libres inhibe la stimulation de la translocation membranaire de GLUT-4 induite par l'insuline [23].

**3. Récepteurs activés par le proliférateur du peroxyosome (PPAR)** Les acides gras libres possèdent également la capacité de réguler l'expression des gènes encodant pour des protéines clés via une activation des PPARs [24]. PPAR- $\alpha$  régule l'expression des protéines impliquées dans l'augmentation de la capture et de l'oxydation des acides gras libres [25],

telles que la déshydrogénase, l'oxydase et la synthétase de l'acyl-CoA, le transporteur FAT-1, CPT-1 et la décarboxylase du malonyl-CoA [24, 26]. De son côté, PPAR- $\gamma$  est exprimé de manière prédominante dans les tissus adipeux et a pour rôle d'augmenter les réserves de triglycérides dans les tissus [24] par l'activation de la lipase des lipoprotéines, de la synthétase de l'acyl-CoA et du transporteur FAT [27]. PPAR- $\beta/\gamma$  régule également l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme myocardique des acides gras, tel que démontré par une diminution de leur oxydation suite à une déplétion de PPAR- $\beta/\gamma$  [28].

**4. Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK)** Le malonyl-CoA, produit de la carboxylase de l'acétyl CoA, est un puissant inhibiteur de CPT-1, et ainsi de l'oxydation des acides gras libres [29]. À son tour, la carboxylase de l'acétyl CoA est régulée par l'AMPK, une kinase responsable de sa phosphorylation et par le fait même de son inhibition [30]. Donc, suite à une augmentation de la demande énergétique tel que lors d'une élévation de l'activité contractile, l'activation de l'AMPK régule à la hausse l'oxydation des acides gras libres.

**5. Insuline** L'insuline a dans un premier temps un effet direct sur le processus myocardique d'oxydation des acides gras libres, par une action inhibitrice de l'AMPK et ainsi de l'enzyme CPT-1 [31]. De plus, des concentrations élevées de l'hormone sont responsables de la suppression de la libération des acides gras libres des réserves sous-cutanées, diminuant les niveaux circulants [32]. Ceci résulte en une diminution de leur disponibilité pour l'oxydation myocardique. Par conséquent, puisque l'impact inhibiteur des acides gras libres sur l'oxydation du glucose est diminué, l'insuline augmente indirectement l'utilisation des glucides [32]. En plus de ses effets au niveau de l'augmentation de la translocation de GLUT-4 [33], l'insuline possède la capacité de stimuler l'activité de l'hexokinase et de la synthétase du glycogène, ayant pour effet une augmentation de la phosphorylation du glucose et de la synthèse du glycogène [34].

En résumé, le muscle cardiaque réalise sa performance contractile grâce à l'énergie métabolique tirée majoritairement de la bêta-oxydation des acides gras libres. De nombreux facteurs régulent cette génération d'ATP afin de pouvoir rencontrer la demande énergétique cardiaque, y compris l'oxygénation, le glucose, les PPARs, l'AMPK et l'insuline.

## 2. FONCTION ET RYTHME CARDIAQUES

Le débit cardiaque est fonction de la fréquence cardiaque et du volume d'éjection systolique ventriculaire moyen. Alors que la fréquence est contrôlée par le système nerveux autonome, la fraction d'éjection systolique est réglée par une combinaison de facteurs intrinsèques (dépendants des concentrations intracellulaires de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de l'ATP et de la structure myocardique) et extrinsèques (état contractile vasculaire, volume et viscosité sanguine).

**RYTHME ET FRÉQUENCE CARDIAQUES** La coordination de la contraction est achevée par un système de conduction spécialisé. En condition physiologique, des influx spontanés naissent dans le nœud sinusal et sont conduits chronologiquement à travers les oreillettes, le nœud atrio-ventriculaire, le faisceau de His, les fibres de Purkinje et les ventricules. Au niveau cellulaire, l'excitabilité électrique est possible grâce à la présence de canaux membranaires dépendants du voltage pour divers ions, incluant le potassium ( $\text{K}^+$ ), le sodium ( $\text{Na}^+$ ) et le  $\text{Ca}^{2+}$ . Contrairement aux autres tissus, les cardiomyocytes présentent une longue période réfractaire ainsi qu'une longue durée de potentiel d'action, permettant ainsi un large influx de  $\text{Ca}^{2+}$  au cours du plateau [35, 36].

**1. Potentiel d'action** Le potentiel d'action d'une cellule musculaire cardiaque est divisé en 5 phases, et les mécanismes ioniques sous-jacents peuvent être résumés ainsi :

- 1) *Phase 0, dépolarisation rapide* : L'atteinte du seuil critique du potentiel membranaire produit une dépolarisation régénérative provoquée par une entrée massive de  $\text{Na}^+$ , conséquente à l'ouverture des canaux dépendants du voltage.
- 2) *Phase 1, repolarisation précoce* : Les canaux  $\text{Na}^+$  sont inactivés et demeurent non disponibles pour l'initiation d'un second potentiel d'action aussi longtemps que la membrane n'est pas repolarisée.
- 3) *Phase 2, plateau* : L'ouverture des canaux dépendants du voltage de type L produit une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Le plateau est maintenu grâce à un équilibre qui provient d'un contrebalancement des courants  $\text{K}^+$  sortants (composantes lente et rapide).
- 4) *Phase 3, repolarisation* : L'inactivation des courants  $\text{Ca}^{2+}$  permet aux courants  $\text{K}^+$  sortants de générer une repolarisation.

5) *Phase 4, potentiel membranaire de repos* : Le potentiel de repos est généré au cours de la diastole. Il est caractérisé par une dépolarisation partielle et spontanée induite par le courant de fond entrant  $\text{Na}^+$ , par le courant calcique  $\text{Ca}^{2+}$  provenant des canaux dépendants du voltage de type T et, finalement, par le courant  $I_f$  provenant d'un canal perméable aux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . La phase de dépolarisation diastolique spontanée est également assurée par la sortie de  $\text{K}^+$  due au courant à rectification entrante ainsi qu'au courant électrogénique généré par la pompe  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ATPase.

**2. Communication intercellulaire** Une fonction cardiaque efficace requiert une activation électrique du myocarde selon un modèle temporel et spatial spécifique. Ce processus est en grande partie dépendant de la distribution et de la fonction des jonctions communicantes. De fait, ces jonctions intercellulaires permettent la diffusion relativement libre des ions et ainsi la transmission du potentiel d'action d'une cellule du muscle cardiaque à une autre. Deux différents types existent, soit latéral et longitudinal. Les jonctions latérales sont moins abondantes et principalement localisées au niveau auriculaire alors que le type longitudinal est prédominant dans le muscle cardiaque [37]. Ces jonctions longitudinales assurent le couplage électrique et la communication directe intercellulaire grâce à des complexes de canaux composés de protéines nommées connexines (Cx). Le cœur présente diverses isoformes de Cx qui diffèrent en termes de conductance : les Cx43 sont localisées de manière prédominante dans les ventricules, alors que les Cx40 sont principalement situées dans les oreillettes et les tissus de conduction [38].

Les Cx sont des phosphoprotéines dont la cinétique de renouvellement et la conductance sont régulées par des changements au niveau de la phosphorylation [39]. La Cx43 représente la plus documentée des Cx : ses sérines sont la cible majeure de phosphorylation, localisées principalement dans la portion C-terminale (21 résidus), alors que ses thréonines largement inférieures en nombre constituent les sites secondaires [40, 41]. Les protéines kinases telles la PKC, la MAP kinase, la caséine kinase-1 et la kinase  $\text{pp60}^{\text{src}}$  sont responsables de la phosphorylation suite à une activation par divers agents endogènes et exogènes [42-44]. Ces derniers incluent les hormones (insuline), les facteurs de croissance (EGF, PDGF), les eicosanoïdes ainsi que les élévations anormales d'ions intracellulaires incluant le  $\text{Ca}^{2+}$ , le  $\text{Na}^+$  et l' $\text{H}^+$  [45].

Le rôle de la phosphorylation semble varier considérablement au cours de la courte demi-vie d'une connexine [46]. En effet, la Cx est phosphorylée lors de son passage du golgi vers la membrane plasmique, lieu où elle s'accumule avec d'autres Cx afin de former les jonctions intercellulaires [47]. À l'opposé de cette phosphorylation initiale à l'activation, les événements de phosphorylation mettent également fin à la brève existence de la connexine. Ils annoncent une diminution de la conductance ainsi qu'une augmentation de l'internalisation et de la dégradation par les systèmes protéosomiques et lysosomaux [48].

**3. Contrôle de la rythmicité et de la conduction** Les systèmes nerveux autonomes sympathique et parasympathique exercent chacun un effet tonique sur le cœur au repos.

**Système nerveux sympathique** Les principaux effets de l'activité cardiaque sympathique sont une augmentation de la force de contraction, de la fréquence et de l'automatisme. Ces actions sont le résultat d'une activation des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques (ADRs) par les catécholamines. Ainsi, suite à la liaison de la noradrénaline, l'adénylate cyclase positivement couplée aux  $\beta_1$ -ADRs augmente les niveaux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) [49]. Ce second messager active une protéine kinase A qui est responsable de la phosphorylation de la sous-unité  $\alpha_1$  des canaux calciques. Il s'en suit une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal, une augmentation de l'influx du courant  $\text{Ca}^{2+}$  entrant et ainsi une augmentation de la force de contraction cardiaque [50, 51]. L'activation des  $\beta_1$ -ADRs est également responsable d'une augmentation de la sensibilité de la machine contractile au  $\text{Ca}^{2+}$ , probablement en réaction à une phosphorylation de la troponine C (Sous-section *Contractilité myocardique*, p.13). De plus, l'augmentation de la capture du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum sarcoplasmique augmente la quantité d'ions disponibles lors du prochain potentiel d'action [52, 53].

Le système nerveux sympathique est également à la source de l'augmentation de la vitesse de dépolarisation spontanée dans les cellules excitatrices du nœud sinusal. Ainsi, le seuil est atteint plus rapidement, élevant la fréquence de décharge et, par conséquent, celle des potentiels d'action. L'augmentation de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  est également à la source de l'augmentation de l'automatisme puisque les concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  ont un

effet sur les courants entrants [54]. Ceci peut toutefois provoquer une série de potentiels d'action provenant d'un seul stimulus (*Arythmies cardiaques post-infarctus*, p.56).

**Système nerveux parasympathique** La stimulation des terminaisons nerveuses parasympathiques provoque la libération de l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur qui induit deux effets suite à la liaison des récepteurs muscariniques de type 2 ( $M_2$ ) :

1) *Diminution de la fréquence par une action sur le nœud sinusal* Les récepteurs  $M_2$  augmentent la perméabilité membranaire au  $K^+$  suite à l'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  [55]. Ainsi, la stimulation vagale est à la source de la libération de  $K^+$  hors des fibres conductrices nodales, ce qui augmente l'état d'hyperpolarisation du potentiel de repos membranaire. Puisque le potentiel de repos est plus négatif, l'atteinte du seuil d'excitation est plus lente et ceci freine le rythme cardiaque [56, 57].

2) *Diminution de l'excitabilité des fibres situées à la jonction atrio-ventriculaire* Les récepteurs  $M_2$  sont couplés de manière négative à l'adénylate cyclase. Donc, contrairement aux  $\beta_1$ -ADRs, la formation de l'AMPc est réduite, ce qui inhibe les courants lents  $Ca^{2+}$  [58, 59]. Conjointement à l'augmentation de la perméabilité au  $K^+$  des fibres membranaires atrio-ventriculaires, la diminution des courants calciques provoque un bloc de conduction au nœud atrio-ventriculaire, ce qui diminue la vitesse de transmission de l'influx cardiaque vers les ventricules [60].

**CONTRACTILITÉ MYOCARDIQUE** Tel que mentionné précédemment, le  $Ca^{2+}$  entre dans les cardiomyocytes au cours du plateau grâce à l'ouverture des canaux dépendants du voltage de type L localisés dans les tubules T. Toutefois, cet influx entraîne des quantités intracellulaires insuffisantes pour induire directement une activation de la machine contractile [61]. De fait, le  $Ca^{2+}$  agit plutôt sur les récepteurs à la ryanodine de type 2, récepteurs responsables de la libération massive de l'ion à partir du réticulum sarcoplasmique [62, 63]. Cette vague secondaire porte les concentrations calciques intracellulaires à des niveaux suffisants (soit environ 100 fois supérieurs) pour lever l'inhibition de la contraction provoquée par la troponine [62, 64]. En d'autres termes, au

niveau des myofibrilles, le  $\text{Ca}^{2+}$  active les forces d'attraction entre l'actine et la myosine [65]. Une source énergétique est nécessaire à ce niveau pour permettre à la contraction de survenir; c'est à ce moment qu'entre en jeu l'ATP qui a été généré majoritairement par les acides gras libres (Sous-Section *Utilisation des métabolites*, p5). De fait, l'énergie nécessaire à la contraction est libérée suite à la dégradation en adénosine diphosphate des ponts hautement énergétiques de l'ATP.

Au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique se trouvent un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) et une pompe continuellement active appelée  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase du réticulum sarcoplasmique et endoplasmique (SERCA2a) [63]. Ces deux derniers sont impliqués dans l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur du réticulum, NCX jouant un rôle majoritaire [66, 67]. Puisque la contraction est maintenue aussi longtemps que les concentrations  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires sont suffisantes, NCX et SERCA2a jouent un rôle indispensable au niveau cardiaque en permettant à chaque influx d'induire une nouvelle contraction. L'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  a également lieu au niveau de la membrane des cardiomyocytes via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  [68].

La force de contraction est reliée au retour veineux, c'est-à-dire au flot sanguin provenant des veines. L'habileté intrinsèque du cœur à s'adapter aux changements de volume répond de la Loi de Frank-Starling [69]. Cette dernière stipule que plus le muscle est étiré au cours du remplissage, plus le contact des filaments d'actine et de myosine s'approche du degré optimal [70]. Ainsi, la force de contraction est davantage élevée, conjointement à la quantité de sang éjectée dans l'aorte. La structure du myocarde peut également influencer la force de contractilité [69]. En présence d'une surcharge de pression, non excessive au point d'endommager le cœur, une hypertrophie compensatrice se développe afin de répondre au travail accru [71]. La masse cardiaque augmente, caractérisée par une augmentation du nombre d'actine et de myosine dans chaque fibre musculaire; le cœur devient ainsi plus efficace à chaque battement [72-75]. La force requise pour propulser le sang au niveau de la circulation pulmonaire est largement inférieure à celle pour la circulation systémique [76]. De fait, alors qu'une pression supérieure à 80 mm Hg doit être construite dans le ventricule gauche pour provoquer l'ouverture des valves et ainsi éjecter le sang dans la circulation périphérique, une pression légèrement au dessus de 8 mm Hg est requise par le ventricule droit [77, 78]. Ceci est expliqué par le fait que la

pression pulmonaire est basse, combinée à une faible résistance, alors que la circulation systémique présente une forte pression et résistance [77].

La force de contraction influence largement la circulation coronaire. Au cours de la systole, cette dernière diminue drastiquement dû à la compression du muscle du ventricule gauche autour des vaisseaux intramusculaires; la circulation se produit ainsi au cours de la diastole, lors de la relaxation musculaire [79]. Le flot à travers les capillaires coronaires du ventricule droit est également soumis à des changements phasiques au cours du cycle cardiaque, mais puisque la force de contraction est largement inférieure à celle du gauche, les variations sont moins prononcées [80, 81]. La localisation des vaisseaux à l'intérieur d'une des trois couches du myocarde se traduit également par une régulation différée du flot sanguin. Au cours de la systole, un gradient de pression se développe dans le muscle, où la pression sous-endocardique est semblable à celle à l'intérieur de la chambre alors qu'au niveau de la couche cardiaque externe, la pression est légèrement supérieure à celle atmosphérique [82]. Ainsi, la pression intramyocardique des couches intérieures est largement supérieure à celle des couches extérieures, comprimant largement plus les vaisseaux sous-endocardiques. Afin de compenser ce manque presque total de flot au cours de la systole, le plexus artériel est plus développé que les artères localisées dans les couches centrale et externe [83].

En somme, chaque cycle cardiaque est initié par la génération spontanée d'un potentiel d'action dans le nœud sinusal. Cet influx est rapidement transmis aux cardiomyocytes adjacents par la participation des Cx et termine ainsi sa course dans les ventricules. La contraction, ou systole, est générée suite à l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  et des métabolites énergétiques. L'énergie fournie sous forme d'ATP provient majoritairement de la bêta-oxydation des acides gras libres, et minoritairement de la glycolyse. Finalement, le cycle cardiaque se termine par la période de relaxation, soit la diastole. Les oreillettes, par le cycle de systole-diastole, agissent à titre de pompe primaire et les ventricules fournissent par la suite la principale source de puissance pour l'éjection du sang dans le système vasculaire. Le volume d'éjection systolique est régulé par les facteurs intrinsèques mentionnés ci-haut, mais est également soumis à des facteurs extrinsèques vasculaires, soit

la pré-charge (pression veineuse centrale) et la post-charge (résistance périphérique et compliance artérielle) cardiaques.

### **3. RÉGULATION DE LA PRESSION ARTÉRIELLE SYSTÉMIQUE**

La pression artérielle est maintenue par une régulation hémodynamique instantanée du débit cardiaque, de la résistance vasculaire périphérique (au niveau des artéioles) ainsi que de la capacitance veineuse. Cette réponse aigue est rendue possible grâce à la participation des mécanismes réflexes et est régie par le système nerveux autonome ainsi que par la relâche endothéliale de substances autacoïdes (Section *Fonction endothéliale*, p.26). À plus long terme, les reins sont également responsables de la régulation de la pression sanguine, par la régulation du volume sanguin ainsi que par la sécrétion d'hormones telles celles dérivées du système rénine-angiotensine (Ang)-aldostérone.

**MÉCANISMES RÉFLEXES** Mise à part une situation de stress ou d'exercice, il existe de nombreux mécanismes de contrôle nerveux qui opèrent en tout temps afin de maintenir la pression artérielle près de ou à son niveau optimal d'opération. Ainsi, les mécanismes réflexes (barorécepteurs, chémorécepteurs ou récepteurs cardiopulmonaires) sont impliqués dans la capture de l'information au niveau cardiovasculaire et, dans la majorité des cas, introduisent une rétroaction négative suite à une analyse au niveau du système nerveux central (SNC).

**1. Réflexe barorécepteur** Le réflexe barorécepteur est de loin le plus connu des mécanismes nerveux impliqués dans le contrôle aigu de la pression artérielle. Il est initié par des mécanorécepteurs sensibles à l'étirement, essentiellement localisés dans le sinus carotidien et la crosse aortique [84]. Ainsi, une pression artérielle moyenne supérieure à 60mmHg dans les artères carotides, et à environ 90mmHg dans l'aorte, est à l'origine de l'étirement des barorécepteurs. Ces derniers sont alors excités, ce qui initie la transmission d'un signal vers le SNC [85, 86]. À partir de ce dernier sont envoyés des signaux de rétroaction via le système nerveux autonome parasympathique afin d'abaisser la pression à un niveau normal [87, 88]. À l'opposé, s'il se produit initialement une diminution de la pression artérielle, les barorécepteurs sont alors inactivés et perdent leur propriété d'inhibition du SNC vasomoteur. Ce système de contrôle de la pression artérielle représente un puissant mécanisme aigu prévenant les changements rapides. Par contre, il n'a que peu

d'impact sur la régulation à long terme puisque les récepteurs s'adaptent en quelques heures au niveau de pression artérielle auquel ils sont exposés, modifiant ainsi leur seuil de transmission de signaux [89, 90]. Une régulation prolongée de la pression artérielle requiert donc d'autres systèmes de contrôle, principalement celui rénal (Sous-Section *Rénine-angiotensine-aldostérone*, p.20) [91].

**2. Réflexe chémorécepteur** Le réflexe chémorécepteur est intimement lié au système barorécepteur puisqu'ils opèrent sensiblement de la même manière [84, 92], à l'exception que les variations chimiques sont à la source de l'activation plutôt que l'étirement. De fait, le manque d'oxygène et l'excès de dioxyde de carbone et d'ions hydrogénés stimulent les cellules chémosensibles localisées dans le corps carotidien ou aortique [93, 94]. L'influx produit par la diminution du flot sanguin est également envoyé au centre vasomoteur afin de le stimuler pour subséquemment élever la pression artérielle [95]. Ainsi, le réflexe chémorécepteur est à l'origine d'un retour à la normale de la pression artérielle suite à une diminution sous les 80mmHg, prévenant ainsi une diminution plus importante.

**3. Réflexe cardiopulmonaire** Les artères pulmonaires et les oreillettes possèdent des récepteurs d'étirement dénommés récepteurs de faible pression [96, 97]. Ces derniers jouent un rôle important en réponse à une variation du volume sanguin. Ainsi, l'étirement des oreillettes par une élévation du volume sanguin induit, via la participation du système nerveux autonome, une vasodilatation des artéioles afférentes rénales. La réduction de la résistance rénale consécutive à la relaxation vasculaire provoque une diminution de la pression capillaire glomérulaire et une augmentation de la filtration des fluides dans les tubules rénaux [98, 99]. Ce réflexe de vasodilatation se produit aussi au niveau de diverses artéioles périphériques mais avec une puissance moindre [100]. Le signal des récepteurs de basse pression est également transmis à l'hypothalamus afin de diminuer la sécrétion de la vasopressine, affectant ainsi indirectement la fonction rénale [101, 102]. La diminution de la sécrétion de cette hormone antidiurétique diminue la réabsorption d'eau au niveau des tubules. Ceci, combiné à la vasodilatation artériolaire rénale, provoque une diminution rapide de la perte de fluides dans l'urine, ce qui contribue efficacement au retour du volume sanguin vers la normale.

L'augmentation de la pression dans les oreillettes est également à l'origine d'une élévation de la fréquence cardiaque [101]. Ce mécanisme peut partiellement être expliqué par une action directe d'étirement du nœud sinusal dû à l'augmentation du volume sanguin. La majorité de l'effet est expliquée par le réflexe de Bainbridge : l'étirement des récepteurs de faible pression induit la transmission d'un signal afférent via le nerf vague jusqu'à la médullaire du cerveau. Par la suite, les signaux efférents sont transmis à travers les nerfs vague et sympathiques afin d'augmenter la chronotropie ainsi que l'inotropie [103].

**SYSTÈME NERVEUX AUTONOME** Le système nerveux autonome joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie de la pression sanguine en assurant la fonction d'arc baroréflexe. C'est à travers les barorécepteurs artériels et cardiopulmonaires, ainsi que des chémorécepteurs, que les centres cardiovasculaires localisés au niveau du tronc cérébral et de l'hypothalamus reçoivent continuellement l'information sur le statut de la circulation périphérique. L'analyse de cette information résulte en l'activation ou l'inactivation des composants efférents sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome afin de fournir un ajustement serré du maintien de la pression sanguine.

**1. Système nerveux sympathique** Le système nerveux sympathique est fonctionnellement et dynamiquement relié au cœur (Sous-section *Rythme et fréquence cardiaques*, p.10) et à l'arbre vasculaire (principalement les petites artérioles) par un dense réseau de fibres [104]. De manière complémentaire à cette innervation directe des tissus cardiovasculaires, le système sympathique est également responsable de l'innervation des surrénales et de la sécrétion subséquente des catécholamines dans la circulation sanguine [105]. Puisque les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) sont les principaux neurotransmetteurs des fibres post-ganglionnaires du système sympathique, la libération par les surrénales et l'activation des ADRs constituent des moyens alternatifs avec lesquels le système sympathique peut influencer les tissus cardiovasculaires [105].

Il existe de nombreux mécanismes pré-synaptiques de facilitation et d'inhibition de la neurotransmission sympathique, permettant ainsi d'exercer un contrôle rigoureux de la pression artérielle. À titre d'exemple, certains neuromédiateurs (ACh, dopamine) ainsi que

des hormones (prostaglandine E<sub>2</sub>, histamine, adénosine, sérotonine) exercent une régulation négative, alors que d'autres hormones (bradykinine, Ang II, adénocorticotrope, neurokinine A) sont impliquées dans la régulation positive de la neurotransmission [105]. Du côté post-synaptique, l'expression du tonus sympathique se traduit par l'activation d'une variété de ADRs couplés à différentes voies de signalisation. Les β-ADR sont couplés positivement à l'effecteur adénylate cyclase par l'entremise des protéines membranaires Gs, donnant lieu à une augmentation de la formation d'AMPc [49]. Les réponses cardiaques et vasculaires, suite à l'activation de ces récepteurs, se traduisent ainsi par une augmentation des fonctions cardiaques (inotropie et chronotropie) ainsi que par une vasodilatation. À l'opposé, la famille des α<sub>2</sub>-ADR est négativement couplée à l'effecteur via la protéine Gi, résultant en une diminution des concentrations intracellulaires du second messager AMPc [105]. La famille des α<sub>1</sub>-ADR utilise une toute autre voie de signalisation, impliquant l'hydrolyse des phosphoinositides membranaires par l'action de la phospholipase C. Deux seconds messagers sont alors générés : le diacylglycérol (DAG), impliqué dans l'activation de la protéine kinase C, et l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>), responsable de la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> à partir du réticulum sarcoplasmique [106]. Les deux sous-classes de α-ADR, contrairement aux β-ADR, provoquent une vasoconstriction et donc une élévation de la résistance vasculaire suite à la liaison de la noradrénaline au niveau des cellules musculaires lisses (CML). Et puisque diverses classes d'ADR coexistent dans le système cardiovasculaire, la nature de la réponse sympathique dépend en grande partie de la sensibilité, de la localisation et de la balance fonctionnelle entre les différentes classes [105].

**2. Système nerveux parasympathique** Au niveau cardiovasculaire, les composantes parasympathiques sont essentiellement distribuées dans le coeur, jouant un rôle circulatoire mineur. Ainsi, tel que mentionné précédemment (Sous-section *Rythme et fréquence cardiaques*, p.10), les influx parasympathiques sont transmis au cœur par le nerf vague et sont ainsi à la source d'une atténuation des fonctions cardiaques, telle la fréquence [105].

**SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRONNE** La pression artérielle est régulée à long terme via la participation du système rénal, plus précisément par le puissant mécanisme de régulation que constitue le système rénine-Ang-aldostérone. Dans un

premier temps, les reins jouent un rôle pivot dans la régulation du  $\text{Na}^+$  et de l'excrétion d'eau, et par conséquent, dans la régulation du volume des fluides extracellulaires. Mis à part cette propriété responsable du maintien de la pression artérielle, les reins régulent également le tonus vasomoteur, systémique et local.

**1. Angiotensine II** L'Ang II est le principal acteur du système rénine-Ang-aldostérone. Sa formation prend naissance au niveau hépatique où son précurseur angiotensinogène est localisé. Dans un premier temps, l'angiotensinogène est clivée en Ang I par la rénine, une aspartyl-protéase générée par les reins. L'Ang I est subséquentement convertie en Ang (1-7) par l'action d'une endopeptidase tissulaire neutre, ou en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) [107-109]. Cette dernière enzyme est également responsable de la dégradation de la bradykinine, un peptide possédant des propriétés vasodilatatrices suite à l'interaction avec son récepteur endothélial [110, 111]. En dernier lieu, l'Ang II peut également être métabolisée en Ang III (2-8) et Ang IV (3-8), réactions catalysées par les aminopeptidases A, N et B ainsi que la dipeptidyl-aminopeptidase II [112].

Le gène de l'ECA 2, un homologue de l'ECA, a été identifié par Donoghue et al. en l'année 2000 [113]. Principalement exprimée au niveau des cellules endothéliales (CE) cardiaques, cette enzyme est responsable de la conversion de l'Ang I en la molécule biologiquement inactive Ang (1-9) [113]. L'ECA 2 est également impliquée dans la conversion de l'Ang II en l'Ang (1-7), un vasodilatateur aux actions natriurétiques [114]. Puisque cette réaction de catalyse de l'ECA 2 représente un mécanisme de clairance de l'Ang II, l'enzyme est également considérée comme un antagoniste d'ECA. Toutefois, l'Ang II est principalement inactivée par diverses enzymes sanguines et tissulaires collectivement appelées angiotensinases. Au cours de sa brève existence dans la circulation, l'Ang II possède quelques principaux effets impliqués dans la régulation de la pression sanguine : la modulation du tonus vasomoteur (augmentation de la contraction, de la génération du stress oxydant et du remodelage vasculaire) et de l'excrétion rénale d'eau et de  $\text{Na}^+$ , mais également du stress oxydant et du remodelage vasculaire.

**Vasoconstriction systémique** L'Ang II induit une élévation de la pression artérielle en causant une vasoconstriction directe, par une stimulation directe des récepteurs AT<sub>1</sub> présents dans le réseau vasculaire [115], et indirecte, en augmentant le tonus sympathique [116] et la relâche de vasopressine.

1) Le sous-type 1 du récepteur à l'Ang II (AT<sub>1</sub>) est couplé à la phospholipase C au niveau endothélial. Son activation induit une élévation des concentrations intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> et une augmentation subséquente de la synthèse de facteurs vasorelaxants (Section *Fonction endothéliale*, p.26) [117]. Toutefois, cette action est largement amoindrie par la liaison de l'Ang II au niveau du sous-type musculaire AT<sub>1</sub>, action qui induit une vasoconstriction [115]. Cette dernière survient intensivement au niveau artériolaire, augmentant la résistance vasculaire et, par le fait même, la pression artérielle [118]. L'induction de la vasoconstriction est moindre au niveau veineux mais elle favorise tout de même l'augmentation du retour veineux au cœur, contribuant ainsi à l'augmentation de la pré-charge et du débit cardiaque [119].

2) L'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> pré-synaptiques facilite la libération du neurotransmetteur noradrénaline, principalement en affectant l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans les terminaisons nerveuses [116]. Ainsi, subséquentement à sa liaison au récepteur, l'Ang II contrôle la fonction des canaux Ca<sup>2+</sup> (ouverture) et K<sup>+</sup> (fermeture) par l'inhibition de la synthèse du second messenger AMPc [105]. L'augmentation de la noradrénaline circulante, tel que mentionné précédemment, augmente la pression artérielle par une vasoconstriction suite à la liaison des récepteurs α-ADRs [105]; de fait, la noradrénaline possède une affinité supérieure pour ce sous-type de récepteur versus le sous-type β qui est plutôt impliqué dans la vasodilatation [49].

3) La vasopressine est une puissante hormone antidiurétique dérivée de l'hypophyse postérieure. Ses effets sont initiés par deux récepteurs distincts localisés au niveau vasculaire et rénal, soit V<sub>1</sub> et V<sub>2</sub> respectivement [120]. La vasoconstriction secondaire à la liaison du sous-type V<sub>1</sub> nécessite la participation de la phospholipase C et l'augmentation subséquente de Ca<sup>2+</sup> dans les cellules musculaires lisses. Ainsi, la

stimulation du récepteur vasculaire à la vasopressine contribue à l'augmentation de la pression artérielle en causant une vasoconstriction [121].

**Vasoconstriction et rétention rénale** L'Ang II possède des effets intrarénaux qui lui permettent de contrôler la rétention sodique et d'eau. L'effet le plus important est probablement la vasoconstriction des vaisseaux rénaux afférents, mécanisme qui diminue le flot sanguin glomérulaire et par conséquent la filtration des fluides dans les tubules [122]. Le flot sanguin est également diminué dans les capillaires péri-tubulaires ; cette réduction de pression provoque une rapide réabsorption osmotique des fluides tubulaires. Mise à part l'action vasculaire, l'Ang II contrôle indirectement la pression artérielle en stimulant la sécrétion d'aldostérone ou la sensation de soif dans le SNC [123]. De plus, son action directe se traduit par la modulation de la réabsorption d'eau et de sodium rénal suite à la stimulation des récepteurs rénaux. Cette dernière action est induite par la liaison de AT<sub>1</sub> au niveau du tubule distal [124], ainsi que par la participation de divers mécanismes de signalisation dans le tube proximal, y compris la participation de la famille Src des tyrosines kinases et des MAPK [125, 126]. En dernier lieu, l'Ang II est responsable de la sécrétion de l'antidiurétique vasopressine [127]. La rétention d'eau au niveau rénal survient à de faibles concentrations de l'hormone et implique l'activation de l'adénylate cyclase dans les tubules collecteurs rénaux ; la stimulation de V<sub>2</sub> mène à l'augmentation du nombre d'aquaporines qui sont des canaux impliqués dans la réabsorption passive de l'eau [128].

L'Ang (1-7) est présente au niveau rénal en concentrations similaires à celles de l'Ang II et est à la source d'effets rénaux complexes [129, 130]. Son rôle dans la régulation de l'hémodynamie rénale n'est pas entièrement élucidé et les données sont contradictoires. Van der Wouden et ses collègues ont démontré qu'à elle seule, Ang (1-7) n'affectait pas la fonction vasculaire rénale mais prévenait la vasoconstriction induite par l'Ang II sur les artères rénales isolées [131]. Toutefois, chez les rats anesthésiés, Ang (1-7) n'a pas affecté la vasoconstriction des artérioles afférentes ou efférentes suite à la stimulation avec l'Ang II, suggérant que l'effet vasodilatateur de Ang (1-7) est masqué *in vivo* [132]. Certaines études suggèrent un rôle régulateur, tel que démontré par l'augmentation du flot sanguin rénal et l'inhibition de la réponse hypertensive de l'Ang II chez les rats Wistar-Kyoto ainsi que spontanément hypertendus [133, 134]. Ces derniers effets sont inhibés par un

antagonisme du récepteur Mas, de la COX ou de la NOS, suggérant une implication des prostaglandines et du NO libérés suite à la liaison de Mas au cours de la vasodilatation.

Au niveau de la régulation de l'excrétion d'eau et de sodium, il a été démontré qu'une infusion intrarénale de Ang (1-7) chez le chien augmentait le flot urinaire et l'excrétion de sodium. Ces actions ont partiellement été abolies par l'antagoniste EXP 3174 du récepteur AT<sub>1</sub> mais non par l'antagoniste PD123319 du récepteur AT<sub>2</sub> [135]. Toutefois, au niveau du rein porcin isolé, Ang (1-7) inhibe l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>-ATPase et cet effet est renversé par un antagonisme du récepteur AT<sub>2</sub> [136]. Dans une suspension de cellules isolées du tubule collecteur, Magaldi et ses collègues ont démontré que Ang (1-7) (10 nM) augmentait la production d'AMPc et que cette réponse était atténuée par l'antagonisme du récepteur Mas et par une inhibition pharmacologique du récepteur à la vasopressine V<sub>2</sub> [137]. Somme toute, Ang (1-7) démontre une propriété antidiurétique dont les mécanismes impliquent une réaction croisée d'activation de Mas, AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> et V<sub>2</sub>.

**2. Aldostérone** Tel que mentionné ci-haut, l'Ang II possède la capacité d'induire la sécrétion de l'aldostérone suite à une action au niveau des glandes surrénales. Cette hormone stéroïdienne augmente la réabsorption du Na<sup>+</sup> et favorise l'excrétion de K<sup>+</sup> par plusieurs actions rénales différées. À titre d'exemple, l'activation de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase survient à court terme par la stimulation de la kinase induite par les glucocorticoïdes (SGK-1) [138] ainsi que de la PKC [139] ; ces dernières sont à la source d'une modulation de l'activité et de la distribution cellulaire des sous-unités pré-existantes de la pompe. À plus long terme, l'expression membranaire de la pompe est conséquent à l'effet transcriptionnel de l'aldostérone, induit suite à la liaison du récepteur minéralo-corticoïde nucléaire [140]. L'augmentation de l'expression des canaux sodiques épithéliaux, soient les protéines limitantes de la réabsorption du sodium au niveau des cellules principales du tubule distal, survient également en deux temps. L'étape rapide est réalisée suite à une promotion du transport des sous-unités pré-exprimées des canaux vers la surface membranaire, via une cascade cellulaire impliquant SGK-1 et PI3-K [141]. La régulation de l'expression à long terme du canal est également secondaire à la transcription des gènes via le récepteur nucléaire. Ainsi, ces diverses actions résultent en une réabsorption sodique rénale et, conséquemment, en une augmentation de la pression

artérielle.

L'identité du récepteur impliqué dans les actions rapides de l'aldostérone demeure un sujet d'actualité. Une école de pensée suggère qu'il existe un récepteur distinct, associé à la membrane, qui initie exclusivement les réponses rapides non-génomiques. Ceci est supporté par quelques études qui démontrent la survenue des réponses rapides chez les souris n'exprimant pas le gène du récepteur nucléaire [142] ou en présence d'un antagoniste du récepteur, tel que le spironolactone et RU26752 [143, 144]. Une autre école de pensée suggère plutôt que les actions non-génomiques seraient, directement ou via diverses molécules de signalisation, induites par la liaison du récepteur nucléaire [145, 146].

En résumé, la pression artérielle n'est pas régulée par un système singulier mais bien par un amalgame de systèmes inter-reliés performant chacun diverses actions. Ainsi, suite à une variation aiguë de la pression artérielle, les mécanismes réflexes (incluant les barorécepteurs) perçoivent l'information et l'envoient aux centres cardiovasculaires localisés dans le tronc cérébral et l'hypothalamus. Il en résulte une activation de la première ligne de défense, soit le système nerveux autonome, afin de fournir un ajustement propre au maintien de la pression sanguine. Par la suite, des mécanismes intermédiaires s'activent en quelques minutes, dont la vasoconstriction induite par l'Ang II. En dernier lieu, à plus long terme, l'action rénale sur la régulation du volume des fluides est mise en action.

#### **4. FONCTION ENDOTHÉLIALE**

Alors que l'endothélium a longtemps été considéré comme une barrière inerte ne possédant aucune propriété fonctionnelle majeure, il est maintenant reconnu en tant qu'organe multifonctionnel et régionalement spécifique. Deux types de CE sont reconnus dans le système cardiovasculaire : les CE endocardiques localisées dans les cavités cardiaques, ainsi que les CE vasculaires qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins. Ces deux formes constituent des populations cellulaires distinctes présentant des divergences au niveau de l'origine embryonnaire, de l'organisation du cytosquelette, de la vitesse de croissance en culture et des propriétés électrophysiologiques [147]. À titre d'exemple, les CE endocardiques proviennent de la vasculogénèse de la plaque cardiogénique tandis que les CE vasculaires sont le résultat de l'angiogénèse à partir des cellules mésothéliales de l'épicarde [147]. Toutefois, les deux types partagent des rôles similaires quant à la production des autacoïdes ainsi qu'à la transduction des signaux induits par les neurotransmetteurs, les hormones ou les stimuli mécaniques.

La localisation confère aux CE la possibilité de contrôler sélectivement la perméabilité et le transport des solutés et des macromolécules [148, 149]. De plus, l'endothélium participe à la régulation des facteurs circulants ou générés localement par l'expression d'enzymes extracellulaires, telles que les enzymes de conversion [149]. Au niveau sanguin, l'endothélium sain présente une surface antithrombogénique, antiplaquettaire, anticoagulante ainsi que profibrinolytique [148, 150-152]. Finalement, les CE possèdent un rôle de modulation de la croissance et de la migration, ainsi que de la contraction et de la relaxation des CML sous-jacentes ou des cardiomyocytes [152, 153]. Cette action sur le tonus moteur est le résultat de la libération d'autacoïdes tels le NO et l'Ang II.

**LE TONUS VASOMOTEUR** Afin de contrôler le tonus vasomoteur, les CE doivent être activées par divers stimuli, incluant les forces de cisaillement ainsi qu'une variété de substances endogènes. Ces dernières sont générées au niveau des cellules du système nerveux autonome (ACh, noradrénaline), sanguines (sérotonine, adénosine diphosphate), ou vasculaires (bradykinine, endothéline [ET-1], Ang II) [153]. En réponse à ces stimuli

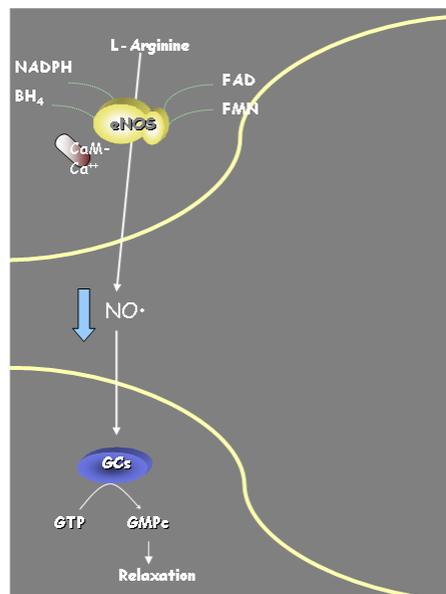
physiques et humoraux, les CE présentent la capacité de modifier leurs fonctions et leur phénotype de sécrétion afin d'induire une vasodilatation ou une vasoconstriction [154].

**1. Les facteurs relaxants dérivés de l'endothélium** En condition normale, l'activation des CE vasculaires génère de manière prédominante une relaxation des CML sous-jacentes, conférant aux facteurs contractants une contribution mineure. Trois principaux facteurs synthétisés au niveau endothélial participent aux relaxations vasculaires : le NO, la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Le médiateur primaire des relaxations dépendantes de l'endothélium au niveau des artères de grand calibre (coronaires, cérébrales, mésentériques et pulmonaires) est le NO. Ainsi, en situation physiologique, la PGI<sub>2</sub> et l'EDHF possèdent des rôles mineurs [155].

**Monoxyde d'azote** Le NO est une molécule de signalisation ubiquitaire générée par la famille des synthétases du NO, enzymes qui catalysent la conversion de l'acide aminé L-arginine en L-citrulline [156]. Trois isoformes de NOS ont été caractérisées, chacune encodée par un gène différent. L'isoforme inductible de la NOS (iNOS) a initialement été découverte au niveau des macrophages mais sa présence est dorénavant démontrée dans presque tous les types cellulaires, incluant les CE et les cardiomyocytes [157-160]. Son activation, indépendante du Ca<sup>2+</sup>, nécessite une stimulation pathologique appropriée par les médiateurs inflammatoires, incluant les cytokines et les lipopolysaccharides, afin d'induire une libération massive de NO [161]. Les isoformes constitutives sont la forme neuronale (nNOS), présente dans le système nerveux autonome, les ganglions cardiaques, les cellules musculaires lisses et les cardiomyocytes [162], ainsi que la eNOS, principalement localisée dans les cardiomyocytes de même que dans les CE coronariennes et endocardiques [163]. Au niveau des cardiomyocytes, il a toutefois été démontré que les deux isoformes constitutives étaient exprimées dans des compartiments subcellulaires distincts, ce qui permet le couplage avec différentes molécules effectrices et l'induction d'une réponse divergente suite à l'activation enzymatique [164].

Selon le mode de stimulation des CE, l'activation de la eNOS peut survenir par deux mécanismes distincts. D'un côté, l'augmentation des forces de cisaillement au niveau de la

paroi vasculaire ou des cavités cardiaques est à la source d'une activation mécanique de l'enzyme. Ce mécanisme implique une phosphorylation par une protéine kinase  $\alpha$ -sérine/thréonine (Akt) [165]. D'un autre côté, une variété de substances endogènes peuvent interagir au niveau de leur récepteur endothélial, situé sur la membrane apicale. Suite à l'interaction avec le récepteur couplé aux protéines  $G_i$  (récepteurs sérotoninergiques, de l'endothéline et ADRs) ou  $G_q$  (récepteurs des kinines et purinergiques), il se produit une augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  [151]. Cette élévation cationique, combinée à la présence d'oxygène, de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) et de cofacteurs (tétrahydrobioptérine [ $BH_4$ ], flavine adénine dinucléotide et flavine mononucléotide), mène à l'activation de la eNOS et ainsi à la formation de NO (Figure 3) [151].



**FIGURE 3.** Synthèse endothéliale du monoxyde d'azote.  $BH_4$  : Tétrahydrobioptérine,  $Ca^{2+}$  : Calcium, CaM : Calmoduline, eNOS : Synthétase endothéliale du monoxyde d'azote, FAD : Flavine adénine dinucléotide, FMN : Flavine mononucléotide, GCs : Guanylate cyclase soluble, GMPc : Guanosine monophosphate cyclique, GTP : Guanosine triphosphate, NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.

Suite à la diffusion du NO au niveau des CML sous-jacentes, la guanylate cyclase soluble est activée et induit une augmentation de la synthèse de la guanosine

monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine 3'5-triphosphate [166]. Le second messager active une protéine kinase G et cette dernière est responsable de l'augmentation de l'efflux du  $\text{Ca}^{2+}$  des CML, de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les réservoirs intracellulaires et de la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Ces actions mènent à l'inhibition de l'appareil contractile [167]. La protéine kinase G est également impliquée dans la phosphorylation des canaux  $\text{K}^+$  dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  afin d'induire une hyperpolarisation et ainsi d'inhiber la vasoconstriction [168].

**Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium** Indépendamment de l'activation de la eNOS et de la cyclooxygénase (COX), des relaxations dépendantes de l'endothélium peuvent être induites par un mécanisme de contact ou de diffusion [169]. Les bases moléculaires de ces relaxations demeurent obscures puisqu'elles varient selon le lit vasculaire étudié, l'espèce, le sexe, le vieillissement et la pathologie [170, 171]. Par contre, que le mécanisme soit physique ou électrique, son initiation repose sur une augmentation intracellulaire endothéliale de  $\text{Ca}^{2+}$  et sur une activation subséquente des canaux endothéliaux  $\text{K}^+$  sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ , de conductance faible et intermédiaire [170]. Cette ouverture mène à une hyperpolarisation des CE, ensuite transmise aux CML par des jonctions hétérocellulaires ou par la diffusion d'un EDHF. Les facteurs diffusibles proposés à ce jour incluent les ions potassiques, le peroxy-nitrite, le peptide natriurétique de type C, les *S*-nitrosothiols ainsi que l'acide époxyécosatriénoïque (11,12-EET, un métabolite du cytochrome P450 2C8/9) [170, 172-175]. Il semblerait toutefois que chacun de ces EDHF participe à la modulation des jonctions hétérocellulaires, favorisant ainsi la transmission de l'hyperpolarisation endothéliale vers les CML sous-jacentes par le mécanisme de contact [176]. Peu importe le mécanisme de transmission, la contribution de cette voie relaxante varie selon le diamètre des artères [177], étant plus marquée au niveau des artères de résistance. Dans les vaisseaux de conductance, l'EDHF et le NO peuvent contribuer aux relaxations dépendantes de l'endothélium, mais le rôle du NO prédomine en condition physiologique. Toutefois, lorsque la synthèse du NO est inhibée, l'EDHF peut induire des relaxations pratiquement normales [155].

**Prostacycline** La synthèse de la PGI<sub>2</sub> dépend initialement d'une augmentation intracellulaire endothéliale de Ca<sup>2+</sup> [178]. Le prostanoïde vasodilatateur est ensuite formé par une activation chronologique de la phospholipase A<sub>2</sub>, de la COX (également nommée synthétase de la prostaglandine H<sub>2</sub>) et de la synthétase de PGI<sub>2</sub>. Contrairement au NO qui diffuse librement à travers la bicouche lipidique des CML, la PGI<sub>2</sub> interagit au niveau de son récepteur membranaire spécifique et ceci limite sa portée d'action [179]. Le récepteur à la PGI<sub>2</sub> est couplé à l'adénylate cyclase, enzyme responsable de la conversion de l'ATP en AMPc [180]. Ce second messenger induit la relaxation vasculaire par une hyperpolarisation secondaire à l'ouverture des canaux K<sup>+</sup> sensibles à l'ATP [181]. De plus, l'AMPc est responsable de l'efflux musculaire du Ca<sup>2+</sup>, ce qui provoque une inhibition de la machine contractile, tel que rencontré avec le NO [182]. Toutefois, il a récemment été démontré que la PGI<sub>2</sub> pouvait également agir à titre de facteur contractant. Chez les rats vieillissants ou hypertendus, l'expression de la synthétase de la PGI<sub>2</sub> augmente, élevant ainsi la production du prostanoïde. Sa liaison se produit au niveau du récepteur thromboxane-prostanoïdes, induisant une contraction plutôt qu'une relaxation [183].

**2. Les facteurs contractants dérivés de l'endothélium** L'endothélium peut induire une contraction du muscle vasculaire sous-jacent en réponse à certains stimuli, par la diminution de la libération des facteurs relaxants et/ou par l'augmentation de celle des facteurs contractants. Ces derniers incluent les prostanoïdes vasoconstricteurs, l'ET-1, l'Ang II et les espèces réactives oxygénées (Section *Régulation des espèces réactives oxygénées*, p.34).

**Prostanoïdes vasoconstricteurs** Les deux principaux prostanoïdes endothéliaux impliqués dans la contraction vasculaire sont la thromboxane A<sub>2</sub> et la prostaglandine H<sub>2</sub>. Cette dernière est le précurseur de tous les autres et dérive de l'acide arachidonique suite à l'action de la COX-1 (expression constitutive) ou de la COX-2 (expression inductible). Par la suite, la synthétase de la thromboxane métabolise la prostaglandine H<sub>2</sub> en thromboxane A<sub>2</sub> [184]. Les deux molécules exercent leur action vasoconstrictrice sur les CML par la liaison du récepteur thromboxane-prostanoïdes. Conséquemment à la diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc, il se produit une augmentation de l'influx du Ca<sup>2+</sup>

par les canaux dépendants du voltage et les canaux-récepteurs [185]. En plus de cette voie de modulation du tonus vasculaire, la COX est à l'origine d'un second mécanisme de vasoconstriction via la production d'anions superoxyde. Ces espèces réactives oxygénées produisent une vasoconstriction par une action directe sur les CML [186] ou par une action indirecte suite à la neutralisation du NO.

**Endothéline-1** L'expression de l'ARNm de ET-1 au niveau endothélial est stimulée par l'hypoxie, les facteurs de croissance, l'Ang II et les neurohormones. Ainsi, l'augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  est à l'origine de la transcription de l'ARNm du précurseur pré-pro-ET-1 [187]. Ce dernier est par la suite converti en big-ET-1 par l'action des convertases et clivé en peptide mature par l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline 1a [188]. [189]. L'ET-1 résultante peut se lier à deux sous-types de récepteurs vasculaires, soit  $ET_A$  et  $ET_B$ . Exprimé à la surface endothéliale, le sous-type  $ET_B$  est impliqué dans la génération d'une vasorelaxation par l'induction de la synthèse du NO et de  $PGI_2$ . En revanche, lorsque de fortes concentrations d'ET-1 sont présentes, cette relaxation est contrebalancée par la stimulation musculaire de  $ET_A$  et  $ET_B$ . De fait, l'activation de la phospholipase C par la protéine Gq couplée aux récepteurs musculaires entraîne la formation d' $IP_3$  et de DAG. Ces deux molécules sont respectivement responsables de l'augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  et de l'activation de la protéine kinase C, induisant une contraction des CML [187]. L'ET-1 est le plus puissant vasoconstricteur connu à ce jour. Toutefois, sa production relativement lente provoquée par la transcription de l'ARNm suggère un rôle dans la régulation du tonus à long terme plutôt qu'aigu. En condition basale, sa génération est inhibée par la synthèse du NO, suggérant une participation mineure au niveau de l'homéostasie vasculaire mais majeure en condition pathologique, tel qu'en présence d'une dysfonction endothéliale [190, 191].

**Angiotensine II** Tel que mentionné précédemment (Sous-section *Système rénine-Ang-aldostérone*, p.20), l'Ang II provient de l'action de la rénine sur le précurseur angiotensinogène, ainsi que de la conversion subséquente de l'Ang I par l'ECA [107]. Le peptide peut lier le sous-type  $AT_1$  localisé au niveau endothélial. Ce dernier est couplé à la phospholipase C et induit une augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  et,

subséquentement, de la synthèse de facteurs vasorelaxants NO et PGI<sub>2</sub> [117]. La liaison du même récepteur peut également conduire, par l'intermédiaire de la protéine Gq, à l'activation de l'oxydase de la NAD(P)H [192]. Cette enzyme pro-oxydante est à l'origine de la synthèse du peroxyde d'hydrogène, candidat potentiel au titre de EDHF [193]. En dernier lieu, la liaison du sous-type endothélial AT<sub>2</sub> stimule la production du NO via la phosphorylation de la eNOS au niveau de Ser<sup>1179</sup> [194]. Toutefois, ces actions sont surpassées par la liaison musculaire de l'Ang II, action qui se solde par une vasoconstriction suite à l'activation du sous-type AT<sub>1</sub> [115]. Ce récepteur, couplé à la protéine Gq, active une protéine kinase C et cette dernière initie une cascade cellulaire qui entraîne une sensibilisation des CML au Ca<sup>2+</sup> par l'action de la protéine Rho.

Provenant de la conversion de l'Ang II par ECA 2, l'Ang (1-7) possède une action vasomotrice qui va à l'encontre de l'activité principale de l'Ang II. Suite à sa liaison endothéliale, l'Ang (1-7) stimule la production de NO, PGI<sub>2</sub> ou EDHF et la contribution relative de chacun dans la relaxation des CML sous-jacentes varie selon l'espèce et le territoire vasculaire [195, 196]. Les mécanismes impliqués dans la libération de la prostacycline et du EDHF demeurent nébuleux [195]. Toutefois, Sampaio et ses collègues ont démontré l'implication du récepteur Mas dans la libération du monoxyde d'azote [197]. Suite à l'interaction de l'agoniste, il s'en suit une phosphorylation du site stimulant Ser<sup>1777</sup> ainsi qu'une déphosphorylation du site inhibiteur Thr<sup>495</sup> au niveau de la eNOS, suite à l'activation de la voie PI3K-Akt [197].

**AUTRES FONCTIONS ENDOTHÉLIALES** L'endothélium cardiaque exerce une fonction paracrine sur la performance du myocarde par la libération de facteurs diffusibles incluant le NO, les prostanoïdes, les peptides natriurétiques, l'Ang II, l'ET-1, les kinines et les espèces réactives oxygénées. Inversement, les cardiomyocytes peuvent également affecter la fonction endothéliale, selon leur état métabolique et mécanique. En effet, les facteurs libérés interagissent avec les CE afin d'induire la libération des médiateurs de la contractilité cardiaque [198]. Les facteurs relaxants NO et Ang (1-7) sont impliqués dans l'inhibition du remodelage des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que des cardiomyocytes. Ils contrôlent la survie cellulaire et préviennent le développement de l'hypertrophie, de la prolifération, de la migration et de la fibrose [195]. Le NO présente

également une action anti-inflammatoire : l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion à la surface endothéliale empêche l'attachement des cellules pro-inflammatoires [148, 150, 152]. De plus, la liaison de l'Ang (1-7) au sous-type musculaire AT<sub>2</sub> inhibe l'effet de promotion de la prolifération, de l'hyperplasie intimale et de l'hypertrophie induit par le sous-type AT<sub>1</sub>, en plus de favoriser l'apoptose [129, 199]. L'action des facteurs vasoconstricteurs tels ET-1 et Ang II est à l'inverse de celle des facteurs relaxants. À titre d'exemple, l'activation musculaire du sous-type AT<sub>1</sub> régule la croissance, la prolifération et la migration cellulaire, la déposition de matrice extracellulaire ainsi que la stimulation de l'inflammation [115].

En résumé, les facteurs endothéliaux jouent un rôle fondamental dans le contrôle de l'intégrité fonctionnelle et structurelle de la paroi artérielle et cardiaque, ainsi que dans la régulation de la pression artérielle systémique par son tonus vasomoteur. Ces actions physiologiques sont rendues possibles grâce à un équilibre entre la libération des facteurs autacoïdes présentant des actions opposées, tels le NO et l'Ang II. Plusieurs autres fonctions cardiovasculaires sont régulées par la participation des facteurs dérivés de l'endothélium, mais leur description va au-delà du champ d'application de la présente thèse.

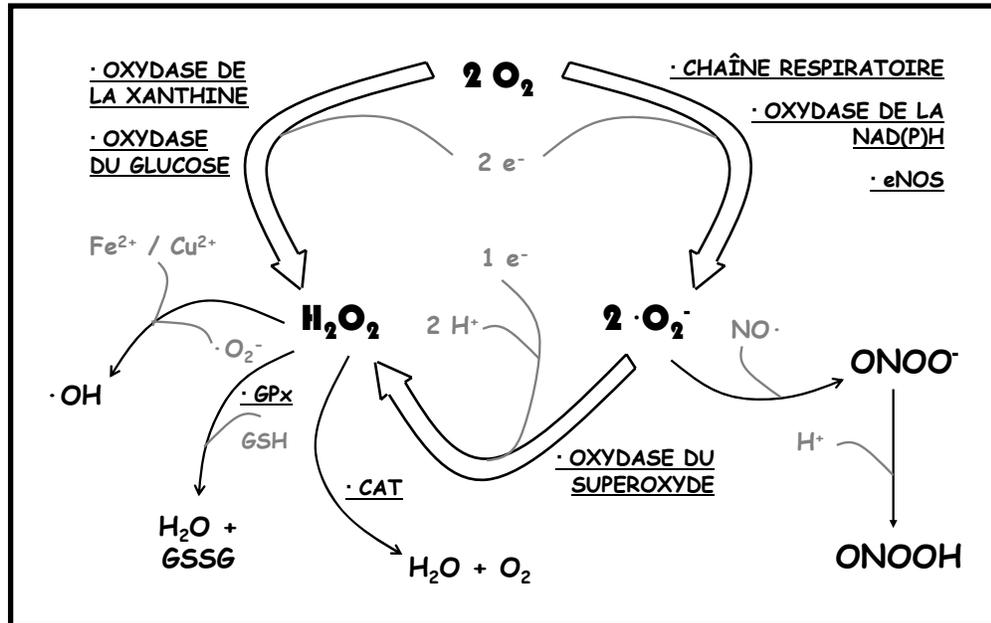
## **5. RÉGULATION DES ESPÈCES RÉACTIVES OXYGÉNÉES**

En présence d'un métabolisme aérobie normal, l'oxygène est soumis à une série de processus d'oxydo-réduction menant à la production d'eau [200]. Pendant cette conversion, il y a constitution d'intermédiaires appelés espèces réactives oxygénées; leur formation implique un mécanisme fondamental de retrait (oxydation) ou d'ajout d'un électron (réduction) par un des nombreux systèmes enzymatiques pro-oxydants. En condition physiologique, ces molécules réactives oxygénées existent en faibles concentrations puisqu'elles sont hautement contrôlées par les systèmes antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques [161].

**PRINCIPALES ESPÈCES RÉACTIVES OXYGÉNÉES** Les espèces réactives oxygénées participant à l'homéostasie vasculaire sont divisées en 2 groupes : les radicaux libres qui présentent un électron libre au niveau de leur orbite externe (anion superoxyde, radical hydroxyl et NO) et les dérivés non-radicalaires (peroxyde d'hydrogène et peroxyde d'azote) [161, 200].

**1. Anion superoxyde** L'anion superoxyde est formé au niveau de toutes les couches de la paroi vasculaire et, étant le précurseur, il constitue le chef de file des autres espèces réactives oxygénées [192, 201, 202]. La principale source de ce radical est une oxydase membranaire qui utilise le nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) ou le NADPH comme substrat pour le don d'un électron à l'oxygène moléculaire [203]. L'anion possède une solubilité lipidique très limitée due à sa charge négative, son passage vers les autres cellules étant seulement possible par la participation des canaux anioniques. Ainsi, il agit presque exclusivement au niveau des cibles proximales situées dans le compartiment où il est généré [204]. L'anion est également une molécule très instable : elle est convertie en l'espace de quelques nanosecondes en peroxyde d'hydrogène par l'enzyme antioxydante dismutase du superoxyde (SOD), ou en peroxyde d'azote suite à une interaction avec le NO (Figure 4). En condition physiologique, la réaction prédominante est l'inactivation par la SOD; toutefois, lorsque le NO et l'anion sont en excès, tel que rencontré lors de

nombreuses situations pathologiques, une quantité significative de l'espèce réactive oxygénée peut être utilisée pour générer le puissant oxydant peroxy-nitrite [205].



**FIGURE 4.** Synthèse des espèces réactives oxygénées. CAT : Catalase,  $\text{Cu}^{2+}$  : Cuivre,  $\text{e}^-$  : Électron,  $\text{Fe}^{2+}$  : Fer, GPx : Peroxydase du glutathion, GSH : Glutathion réduit, GSSG : Glutathion disulfide,  $\text{H}^+$  : Proton,  $\text{H}_2\text{O}$  : Eau,  $\text{H}_2\text{O}_2$  : Peroxyde d'hydrogène,  $\text{O}_2$  : oxygène,  $\cdot\text{O}_2^-$  : Anion superoxyde, OH : Radical hydroxyl,  $\text{ONO}_2^-$  : Peroxynitrite,  $\text{ONOOH}$  : Acide peroxy-nitrique.

**2. Peroxynitrite** La formation du peroxy-nitrite est principalement due à la réaction excessivement rapide ( $6,7 \times 10^9$  M/sec) de deux radicaux, soit l'anion superoxyde et le NO (Figure 4) [206]. Cette réaction survient dans un ratio de 1:1 et génère une espèce réactive azotée non-radicalaire : l'interaction des deux électrons libres induit la formation d'un pont et donc leur neutralisation [207]. À pH physiologique, le peroxy-nitrite peut gagner un proton pour former l'acide peroxy-nitrique, une molécule très instable possédant une demi-vie inférieure à une seconde [208]. Elle est rapidement décomposée en un puissant oxydant similaire au radical hydroxyl en ce qui a trait à sa réactivité [209]. Ainsi, le peroxy-nitrite exerce ses effets par différents types de réaction qui peuvent être classifiés en 3 catégories : 1) suite au clivage homolytique de l'acide peroxy-nitrique, par la génération de puissants

oxydants, 2) en réagissant avec le dioxyde de carbone pour former davantage de radicaux libres nocifs [210] et, 3) en agissant directement au niveau de ses cibles. Toutefois, en condition physiologique, plusieurs étapes limitent la formation d'une quantité suffisante de peroxyde d'azote pour exercer un effet néfaste significatif. En effet, 1) la concentration circulante de NO en condition basale est relativement basse, 2) une concentration équimolaire d'anion superoxyde est requise pour la formation du peroxyde d'azote, et 3) la courte demi-vie du peroxyde d'azote prévient l'accumulation tissulaire et limite la distance de diffusion [211]. Ainsi, cette espèce réactive oxygénée est significativement présente seulement en condition de stress oxydant.

**3. Peroxyde d'hydrogène** Le peroxyde d'hydrogène provient majoritairement de la réaction de catalyse de l'anion superoxyde (Figure 4). Par ailleurs, ce radical peut également être généré spontanément par l'oxydase de la xanthine et celle du glucose, via un processus de don direct de deux électrons à l'oxygène, sans la formation intermédiaire de l'anion [204]. Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive oxygénée non chargée qui, contrairement à l'anion superoxyde et au peroxyde d'azote, est suffisamment stable pour diffuser vers d'autres cellules et y initier des événements spécifiques de signalisation [204]. Dans les systèmes biologiques, il peut être neutralisé par deux systèmes enzymatiques distincts : la catalase et la peroxydase du glutathion. Cette dernière utilise le glutathion réduit pour convertir le peroxyde d'hydrogène en eau alors que la catalase agit sans la présence de cofacteur pour également générer de l'eau [212]. Finalement, le peroxyde d'hydrogène peut également être métabolisé par les myéloperoxydases pour former l'acide hypochlorique, ou interagir avec des métaux de transition réduits, le fer ou le cuivre, afin d'être converti en radical hydroxyl (Figure 4) [213].

**4. Radical hydroxyl** Ce radical libre extrêmement réactif et hautement instable peut être formé à partir du peroxyde d'hydrogène selon deux réactions : en présence de métaux de transition bivalents tels le cuivre et le fer (réaction de Fenton) et en entrant en contact avec l'anion superoxyde (réaction d'Haber-Weiss). Tout comme le peroxyde d'azote, ce radical est formé en quantités négligeables en condition physiologique, ne contribuant aux dommages cellulaires qu'en condition de stress oxydant [214].

**SOURCES ENZYMATIQUES DES ESPÈCES RÉACTIVES OXYGÉNÉES** Les cellules inflammatoires, tels les macrophages et les neutrophiles, génèrent des espèces réactives oxygénées pour la défense de l'hôte. Ces cellules libèrent ainsi des quantités toxiques d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène via leur myéloperoxydases en réponse aux organismes envahisseurs [215]. Ce système leucocytaire, en plus des enzymes impliqués dans le métabolisme de l'acide arachidonique (COX, synthétase de la prostaglandine H<sub>2</sub> et lipoxygénase) [216], représente une source additionnelle, bien que minoritaire, dans la génération cardiovasculaire des espèces réactives oxygénées. Les principales enzymes sont localisées au niveau mitochondrial (chaîne de transport des électrons) ou dans les différentes couches cellulaires du système cardiovasculaire.

**1. Mitochondries** La chaîne respiratoire mitochondriale est la principale source d'énergie de la cellule et catalyse le transfert d'électrons via la participation de plus de 80 peptides organisés en quatre complexes [217]. Ce transfert, réalisé par les navettes ubiquinone et cytochrome C, mène habituellement à la formation aérobie de l'ATP par le complexe V. Toutefois, un faible pourcentage d'électrons est perdu dans la chaîne respiratoire : environ 1-2 % de la quantité totale d'oxygène est convertie en anion superoxyde au niveau des complexes I et III [218]. Ce dernier est par contre libéré vers le côté cytosolique où une concentration élevée de la SOD-manganèse est présente pour le neutraliser rapidement [217]. Il existe également un mécanisme de rétroaction par les espèces réactives oxygénées au niveau des protéines de découplage (UCP-2 et 3). Ces UCP sont des transporteurs de la membrane interne mitochondriale qui contrôlent le degré de découplage entre l'expulsion des protons au niveau des complexes I, III et IV et la production d'énergie (ATP). Ainsi, l'élévation des niveaux d'anion superoxyde provoque une augmentation du transport des protons par les UCP, ce qui diminue le gradient électrochimique et facilite le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. La production de radicaux libres est donc diminuée concomitamment à la perte d'électrons. Finalement, la mitochondrie possède la capacité de générer des espèces réactives oxygénées à l'extérieur de sa membrane externe par l'oxydation des monoamines via l'oxydase membranaire de la monoamine [219].

**2. Xanthine oxydoréductase** La xanthine oxydoréductase est une enzyme ubiquitaire qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine, générant respectivement la

xanthine et l'acide urique au cours du métabolisme des purines. L'enzyme existe sous deux formes interchangeables fonctionnellement distinctes : la déshydrogénase et l'oxydase de la xanthine [220]. La déshydrogénase est convertie en oxydase suite à une oxydation réversible du groupement sulfhydryl ou conséquemment à des modifications protéolytiques irréversibles. Alors que la déshydrogénase réduit préférentiellement le  $\text{NAD}^+$ , l'oxydase s'attaque à l'oxygène moléculaire afin de générer l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène [221].

**3. NOS** En condition physiologique, la NOS est responsable de la synthèse du facteur relaxant dérivé de l'endothélium NO. Par contre, dans certaines conditions, l'enzyme peut également être à la source de la génération de l'anion superoxyde. La eNOS, tout comme les deux autres formes de l'enzyme, est dépendante de l'implication de la L-arginine et de la  $\text{BH}_4$  pour la synthèse du NO [156]. Toutefois, si la biodisponibilité du substrat est faible ou si le cofacteur  $\text{BH}_4$  est oxydé, la eNOS se trouve découplée et transfère les électrons à l'oxygène moléculaire, générant ainsi des quantités significatives d'anion superoxyde [222].

**4. Oxydase de la NAD(P)H** La source primaire au niveau vasculaire est un complexe enzymatique membranaire appelé oxydase de la NAD(P)H, enzyme dont la fonction exacte en condition physiologique n'est pas connue [201]. La production de l'anion superoxyde survient lorsque l'oxygène est réduit par un électron provenant du substrat NADH et/ou NADPH [223]. Cette enzyme fût initialement identifiée au niveau des cellules phagocytaires et, par la suite, dans les cellules non phagocytaires vasculaires telles les CE, les CML et les fibroblastes [224, 225]. Toutefois, la structure et les fonctions de l'oxydase leucocytaire et vasculaire présentent certaines différences.

Contrairement à la forme phagocytaire qui génère des espèces réactives oxygénées sous forme d'explosion suite à une stimulation, l'oxydase vasculaire est constitutivement pré-assemblée, produisant faiblement mais de manière soutenue l'anion et le  $\text{H}_2\text{O}_2$  [223, 226]. Elle est régulée par plusieurs facteurs humoraux, incluant les cytokines, les agents vasoactifs (Ang II) et les facteurs de croissance. Les facteurs physiques, tels l'étirement, les

forces de cisaillement et la tension pulsatile, stimulent également l'oxydase vasculaire de la NAD(P)H [192]. Au niveau phagocytaire, l'activation de l'enzyme ne survient que lorsque les facteurs cytosoliques sont recrutés à la membrane et associés avec le cytochrome b558. Cette translocation du complexe cytosolique se produit en présence d'une phosphorylation de p47<sup>phox</sup>, soit suite à une stimulation appropriée [227]. La cinétique d'activation est relativement lente pour les cellules vasculaires (minutes à heures), comparativement à quasi instantanée pour les neutrophiles [228]. Finalement, les deux types d'oxydase possèdent une affinité différente pour le substrat. Dans les cellules phagocytaires, le seul substrat utilisé est le NADPH alors que dans les cellules vasculaires, l'affinité est supérieure pour le NADH comparativement au NADPH [229].

Toutes les sous-unités de la forme phagocytaire sont exprimées à divers degrés au niveau des composantes vasculaires. Communément, il existe 3 sous-unités cytosoliques régulatrices (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, Rac-1) et un domaine hétérométrique cytochrome b558. [230]. Ce complexe est responsable de la liaison du substrat ainsi que du transfert d'électron et est composé d'une sous-unité  $\alpha$  (p22<sup>phox</sup>) et d'une sous-unité  $\beta$  (gp91<sup>phox</sup>, nox1, nox3, nox4 ou nox5) [223]. La nature de la sous-unité  $\beta$  dépend du type cellulaire : la gp91<sup>phox</sup> est associée à l'isoforme endothéliale vasculaire alors que la nox1 est impliquée dans la formation de l'anion au niveau des CML [231]. La composition globale de l'oxydase des fibroblastes est toutefois controversée : dans quelques cas, chacune des sous-unités a été démontrée [201] alors que d'autres études démontrent seulement la présence de p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> [232]. Du côté leucocytaire, la composante p60<sup>phox</sup> est ajoutée au complexe cytosolique. Contrairement aux oxydases vasculaires, la petite protéine G est Rac-2 et la composante impliquée dans le transfert d'électron est exclusivement gp91<sup>phox</sup> [233].

**ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES ENDOGÈNES** Le statut oxydant est en partie contrôlé par un large spectre d'antioxydants non-enzymatiques, incluant l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), le caroténoïde ( $\beta$ -carotène), les flavonoïdes, la bilirubine, l'acide urique et le glutathion [149]. Par contre, il ne sera question ici que des défenses enzymatiques antioxydantes, incluant la catalase, la peroxydase du glutathion (GPx) et la dismutase du superoxyde.

**1. Dismutase du superoxyde** La dismutase du superoxyde catalyse la réaction de neutralisation de l'anion superoxyde par l'ajout d'un électron et de deux protons; il en résulte une libération de peroxyde d'hydrogène. Trois isoformes de la dismutase ont été identifiées chez les mammifères. La SOD1 (ou SOD cuivre/zinc) est localisée au niveau du cytosol, du noyau et minoritairement de la mitochondrie de presque tous les types cellulaires [234]. Elle représente l'isoforme cardiovasculaire majoritaire, exerçant approximativement 50 à 80 % de l'activité totale des SOD, et est impliquée dans la dismutation de l'anion superoxyde dérivé de la eNOS [235]. La SOD2 (ou SOD-manganèse) est située dans la matrice mitochondriale et représente la première ligne de défense impliquée dans la neutralisation de l'anion superoxyde généré par la chaîne respiratoire [236]. La SOD3 (ou SOD extracellulaire) est une isoforme sécrétée et liée aux polysaccharides sulfatés tel que l'héparan sulfate à la surface cellulaire [236].

**2. Catalase** Cette enzyme antioxydante est l'une des plus efficaces puisqu'aucune concentration de peroxyde d'hydrogène ne peut la saturer [237]. De fait, elle possède le plus haut taux de conversion établi en enzymologie (environ  $10^7$  mol·sec<sup>-1</sup>), transformant le peroxyde d'hydrogène en eau et en une molécule d'oxygène. La catalase n'est pas essentielle pour tous les types cellulaires en condition physiologique mais, suite à une exposition chronique au stress oxydant, son expression est augmentée afin de lui permettre de jouer son rôle de détoxification [238].

**3. Peroxydase du glutathion** Le NADPH, substrat des enzymes pro-oxydantes, est également utilisé en tant qu'équivalent réducteur pour maintenir les réserves de glutathion réduit. Ce glutathion réduit fait don d'un électron qui est transféré au peroxyde d'hydrogène par la GPx afin de former une molécule d'eau et d'oxygène. Subséquemment, le glutathion disulfide oxydé généré retourne à l'état réduit par la réductase du glutathion [239]. Il existe au moins 5 isoformes de GPx chez les mammifères (GPx1 à 5), et celle impliquée dans la réduction du peroxyde d'hydrogène est la GPx1 (ou GPx cytosolique). Cette dernière est exprimée dans la majorité des tissus mais est prédominante aux niveaux rénal, érythrocytaire et hépatique [240].

RÔLES PHYSIOLOGIQUES DES ESPÈCES RÉACTIVES OXYGÉNÉES La pensée conventionnelle décrit les espèces réactives oxygénées comme étant des molécules aux effets exclusivement délétères au niveau cardiovasculaire, menant à des processus pathologiques. Par contre, en condition physiologique, ces dernières sont produites de manière contrôlée en faibles concentrations et participent au maintien de l'homéostasie. Dans un premier temps, l'anion superoxyde ne possède pas d'action modulatrice de la réactivité vasculaire en condition physiologique et la réaction prédominante est une inactivation rapide en peroxyde d'hydrogène par la dismutase du superoxyde [235]. Cette dernière espèce réactive oxygénée possède toutefois la capacité d'agir à titre d'EDHF, générant une vasorelaxation des CML sous-jacentes par une action sur les canaux  $K^+$  de large conductance dépendants du  $Ca^{2+}$  [170].

Ensuite, les espèces réactives oxygénées participent au remodelage cardiovasculaire par la stimulation de la prolifération, de l'hypertrophie et de la survie cellulaire dans différents types cellulaires, incluant les cardiomyocytes et les CML [223, 228, 241]. Toutefois, dépendamment du type, de la durée et de la concentration, l'exposition aux espèces réactives oxygénées peut également mener vers une suppression de la croissance et conduire vers une apoptose [241]. La propriété d'induction de la prolifération est également impliquée dans le processus d'angiogenèse, mécanisme essentiel au le développement embryonnaire et à la réparation tissulaire. De fait, les espèces réactives oxygénées agissent au niveau de trois événements clés : l'induction de la prolifération et de la migration des CE pour former une tubulure, ainsi que l'activation des lymphocytes [242]. En dernier lieu, le peroxyde d'hydrogène peut être bénéfique lorsqu'il est généré par les neutrophiles, les macrophages et les cellules infectées lors de la défense de l'hôte contre une invasion bactérienne [215, 230]. Malgré la participation à ces rôles physiologiques, l'état de stress oxydant fait passer leur rôle de molécules bénéfiques à délétères.

STRESS OXYDANT : RÔLES PATHOLOGIQUES DES ESPÈCES RÉACTIVES OXYGÉNÉES Le stress oxydant, rencontré en présence de nombreuses conditions pathologiques, se caractérise par une concentration excessive d'espèces réactives oxygénées. Cette surexpression est la conséquence d'une production incontrôlée par les

enzymes pro-oxydantes ou d'une incapacité de neutralisation complète par le système antioxydant.

En situation de stress oxydant, le NO et l'anion superoxyde sont en concentrations suffisantes pour induire une génération significative de peroxy-nitrite au niveau des cellules non-phagocytaires [230]. Ce dernier possède la capacité d'induire une vasoconstriction selon trois mécanismes différents. Dans un premier temps, le peroxy-nitrite inactive la synthétase de la PGI<sub>2</sub>, diminuant la synthèse de ce facteur relaxant [243, 244]. Par la suite, la prostaglandine H<sub>2</sub> non métabolisée en PGI<sub>2</sub> peut interagir au niveau des récepteurs thromboxane-prostanoïdes des CML, induisant une vasoconstriction. En dernier lieu, la réduction du cofacteur BH<sub>4</sub> par le peroxy-nitrite induit un découplage fonctionnel de la eNOS [245]. Ainsi, l'enzyme génère davantage d'anion superoxyde, et ultérieurement de peroxy-nitrite, aux dépens du NO [235]. Il se produit alors le développement d'une dysfonction endothéliale, état caractérisé par une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium. Cette altération causée par le stress oxydant est présente dans de nombreuses pathologies liées à l'obésité, incluant l'hypertension, la maladie vasculaire associée au diabète de type 2 et l'athérosclérose.

Plusieurs effecteurs des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, tels les LDL oxydés et l'Ang II, favorisent la dysfonction endothéliale et la mort cellulaire via des mécanismes oxydants [223, 246, 247]. En d'autres termes, ils stimulent ou sensibilisent les cellules vasculaires à générer des espèces réactives oxygénées; ces derniers servent de seconds messagers dans l'activation de la production de molécules d'adhésion et/ou d'autres produits de gènes inflammatoires vasculaires. L'expression des molécules d'adhésion à la surface cellulaire favorise l'infiltration des macrophages dans la paroi vasculaire et la libération de signaux pro-inflammatoires additionnels [161]. De manière complémentaire à ces processus qui contribuent au dommage vasculaire, les espèces réactives oxygénées sont impliquées dans la peroxydation des lipides, la croissance des CML et l'augmentation de la déposition des protéines matricielles [248]. Ces diverses manifestations convergent vers le développement de l'athérosclérose.

Au niveau cardiaque, les espèces réactives oxygénées sont impliquées dans le développement de la fibrose et de l'hypertrophie des cardiomyocytes, deux phénomènes

caractéristiques de l'hypertrophie ventriculaire gauche. Dans une culture de cardiomyocytes hypertrophiés isolés du rat, Nakagami et al. ont démontré que l'hypertrophie est subséquente à une augmentation de la formation de l'anion superoxyde et de l'activité de l'oxydase de la NAD(P)H [249]. Le traitement avec l'antioxydant probucol prévient le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche dans un modèle de cerclage aortique chez le porc, démontré par une inhibition de l'hypertrophie des cardiomyocytes et du développement de la fibrose interstitielle [250].

Plusieurs études ont démontré que le stress oxydant joue également un rôle important dans le remodelage des fibres nerveuses sympathiques ventriculaires et auriculaires. Ceci a été démontré chez les lapins présentant une hypercholestérolémie [251], chez les souris avec infarctus du myocarde [252] ainsi que chez les chiens avec une tachy-stimulation [253]. Plus précisément, le stress oxydant est à la source d'un dommage neuronal cardiaque, se traduisant par la dénervation. Il s'en suit une stimulation de la réexpression des gènes des facteurs de croissance neuronaux et autres facteurs neurotrophiques dans les cellules non neuronales [254-256], et ainsi une régénération nerveuse par la germination des fibres sympathiques présentes [257, 258] [259] [260].

En résumé, les espèces réactives oxygénées sont continuellement produites en condition physiologique par les enzymes pro-oxydantes, telle l'oxydase de la NAD(P)H. Elles exercent plusieurs rôles au niveau cardiovasculaire avant d'être neutralisées par les systèmes de défense antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Par contre, en présence d'un déséquilibre entre les systèmes anti- et pro-oxydants, il se produit une augmentation de la génération des espèces réactives oxygénées menant à l'état de stress oxydant. Cette condition est rencontrée lors de nombreux états pathologiques associés à l'obésité (voir le Chapitre Troisième) et se caractérise par des effets délétères chroniques au niveau de la cellule et de ses constituants.

# **CHAPITRE TROISIÈME :** **ALTÉRATIONS PATHOLOGIQUES RELIÉES À** **L'OBÉSITÉ**

---

L'incidence de la surcharge pondérale et de l'obésité dans les pays occidentaux a dramatiquement augmenté depuis les dernières années. Aux États-Unis, 66 % de la population présente de l'embonpoint alors que le tiers de cette proportion est obèse [1]. L'obésité est reconnue comme étant un facteur de risque indépendant pour l'hypertension, le diabète et la dyslipidémie, soit les trois altérations qui constituent le syndrome métabolique. De plus, ces manifestations augmentent considérablement le risque de maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose et l'infarctus du myocarde.

## **1. DYSLIPIDÉMIE ET ALTÉRATIONS MÉTABOLIQUES**

L'élévation des concentrations circulantes de lipides, combinée à une augmentation de leur capture, est à la source d'un changement phénotypique du métabolisme cardiaque [261]. Initialement, le changement métabolique avait été attribué à un déséquilibre entre la capture et l'oxydation de ces acides gras, tel que retrouvé au niveau des muscles squelettiques et du foie [262, 263]. Toutefois, plusieurs études cliniques et expérimentales ont démontré qu'en présence d'obésité établie, l'augmentation de la capture [264, 265] était couplée à une utilisation myocardique excessive de cette source énergétique [264, 266, 267]. L'oxydation lipidique abusive mène à la génération et à l'accumulation de métabolites toxiques qui compromettent la fonction contractile cardiaque. De plus, les acides gras non utilisés entrent dans une voie délétère de synthèse de lipides, induisant entre autres la formation *de novo* de céramide. L'apoptose résultante cause une perte de cardiomyocytes, provoquant le développement d'une cardiomyopathie lipotoxique [268]. L'accumulation des lipides dans le myocarde est également à la source du développement de résistance à l'insuline qui est une diminution de la réponse à l'hormone en présence de concentrations plasmatiques normales. De fait, la présence des triglycérides est à la source de l'activation de la protéine kinase C impliquée dans la phosphorylation du substrat du récepteur à

l'insuline (IRS-1). Cette phosphorylation entraîne une diminution de l'activité de la phosphoinositol 3-kinase (PI3-K) et subséquemment de la capture du glucose [269]. Ainsi, la présence d'une dyslipidémie, diminue progressivement l'impact de l'insuline sur la glycose.

Tel que mentionné précédemment (Sous-section *Régulation de l'utilisation des métabolites*, p.6), l'augmentation de l'oxydation des acides gras libres conduit à la diminution du transport du glucose (GLUT) ainsi qu'à l'inhibition de la glycolyse [23, 266]. De plus, en présence d'obésité, cette utilisation lipidique excessive fournit une abondance de cofacteurs nécessaires à certaines étapes clés de la néoglucogenèse, augmentant ainsi la production de glucose par le foie. Ceci mène donc graduellement au développement de l'intolérance au glucose, soit un état intermédiaire entre la normoglycémie et le diabète (hyperglycémie) [270]. Les niveaux d'insuline augmentent progressivement afin de contrer l'élévation des concentrations plasmatiques de glucose [271], mais puisque l'obésité est également associée à une résistance à l'insuline, la combinaison mène au développement du diabète.

Le diabète de type II est principalement rencontré chez les patients obèses et son incidence augmente progressivement avec l'âge, avec le déclin de la fonction des cellules bêta-pancréatiques. Ce désordre métabolique chronique est caractérisé par une concentration plasmatique élevée de glucose secondaire à une résistance et/ou à une dysfonction de la sécrétion de l'insuline. De fait, tel que mentionné ci-haut, l'augmentation de la capture des lipides n'est pas couplée à une augmentation de leur utilisation mis à part au niveau du myocarde [264, 266, 267]. Ainsi, la lipotoxicité pancréatique subséquente, jointe à la glucotoxicité secondaire à l'hyperglycémie chronique, induit le développement d'une dysfonction des cellules bêta-pancréatiques, état caractérisé par une diminution de la synthèse de l'insuline [272]. Les patients diabétiques souffrent de développement prématuré et sévère d'athérosclérose, d'altérations microvasculaires et d'insuffisance rénale chronique. Des études post-mortem réalisées sur des cœurs diabétiques ont également confirmé que les maladies cardiovasculaires étaient augmentées de 3 à 4 fois comparativement aux spécimens non-diabétiques [273]. De plus, suite à un infarctus du myocarde, les sujets diabétiques présentaient une augmentation de la mortalité et de la fréquence de récurrence comparativement aux non-diabétiques [273].

## 2. ALTÉRATIONS VASCULAIRES

HYPERTENSION ARTÉRIELLE SYSTÉMIQUE L'hypertension artérielle est une affection commune du 21<sup>e</sup> siècle qui se définit comme une pression systolique/diastolique supérieure ou égale à 140/90 mmHg [274]. Plusieurs chiffres indiquent que cette atteinte artérielle est un véritable défi de santé publique. De fait, Statistiques Canada rapporte qu'en 2004, 72 743 décès ont été causés par les maladies de l'appareil circulatoire, et qu'en 2005, 4 052 614 Canadiens étaient atteints d'hypertension artérielle.

En condition normale (Section *Régulation de la pression artérielle*, p.17), l'arc baroréflexe est très efficace afin de conserver l'homéostasie circulatoire dans l'intervalle étroit de la normale. Le maintien chronique d'une pression artérielle élevée ne peut donc survenir qu'en présence d'une altération fonctionnelle de la sensibilité à divers niveaux de l'arc. De fait, la désensibilisation de ce dernier a été démontrée chez les patients hypertendus et se manifeste par une augmentation du seuil d'inhibition du système nerveux sympathique [275]. De plus, les fonctions post-synaptiques  $\alpha_1$ -adrénergiques sont potentialisées dans les tissus cardiovasculaires au détriment des fonctions  $\beta$ -adrénergiques [276]. Cette augmentation du tonus sympathique vasoconstricteur pourrait être consécutive à une augmentation du stress oxydant puisqu'il a été démontré que l'anion superoxyde participe à la dominance de l'expression des  $\alpha_1$ -ADRs [277]. Ainsi, la prépondérance du sous-type  $\alpha_1$  contribue au développement ainsi qu'au maintien de l'hypertension par l'induction de la contraction des CML suite à l'action des catécholamines [278].

En plus de son action directe sur le système cardiovasculaire, le système sympathique peut intimement et positivement interagir avec d'autres systèmes hormonaux, dont celui rénine-Ang-aldostérone. D'un côté, le système sympathique peut stimuler la sécrétion de rénine par une activation des  $\beta$ -ADRs rénaux [279]. D'un autre côté, l'Ang II facilite la libération de la norépinéphrine des terminaisons nerveuses sympathiques et des catécholamines de la glande surrénale par une stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> [280]. Grâce à ces actions réciproques, les deux systèmes peuvent mutuellement s'activer afin de créer une boucle de rétroaction positive chez les patients hypertendus [105]. À plus long terme, l'augmentation du tonus sympathique et la présence de l'hypertension artérielle favorisent le

développement d'un remodelage vasculaire et cardiaque, ce qui constitue un risque important pour des événements ischémiques locaux et une diminution de la réserve coronarienne [281] ainsi que pour la survenue d'un infarctus du myocarde, de l'insuffisance cardiaque ou de la mort subite [282].

**1. Remodelage vasculaire** La caractéristique hémodynamique primaire de l'hypertension artérielle est l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique subséquente à diverses altérations structurelles, mécaniques et fonctionnelles [283]. Le changement structurel majeur est le remodelage vasculaire, qui entraîne une diminution du diamètre de la lumière et un épaississement de la média. Plus précisément, il se produit une hyperplasie, une hypertrophie et une élongation des cellules musculaires lisses, une réorganisation de ces cellules autour de la lumière du vaisseau et une altération de la composition adventitielle de la matrice extracellulaire [284]. Le remodelage vasculaire qui survient en présence d'hypertension artérielle est aussi caractérisé par une altération de la réactivité vasculaire [285]. La dysfonction endothéliale semble être une conséquence de l'hypertension puisqu'une variété de traitements visant à diminuer la pression artérielle normalise les relaxations dépendantes de l'endothélium [286]; toutefois, l'altération vasculaire contribue au maintien de l'hypertension puisque l'inhibition des facteurs relaxants augmente la résistance vasculaire. La fibrose périvasculaire survient également de manière précoce, provoquée par la surcharge hémodynamique contre la paroi vasculaire ou subséquemment à une action hormonale. Il en résulte une diminution de la réserve coronaire et cette altération de la vasodilatation initie un processus de diminution de la perfusion et de malnutrition, ce qui peut induire une diminution de la performance myocardique [287, 288].

**2. Remodelage cardiaque** L'augmentation chronique de la pression sanguine est à l'origine d'une série d'événements cellulaires et moléculaires menant à une hypertrophie cardiaque adaptative [71]. Cette réponse est caractérisée par une augmentation du volume cellulaire des cardiomyocytes, une prolifération des cellules non-cardiomyocytes (principalement des fibroblastes), une activation de l'expression des gènes fœtaux (peptides natriurétiques de type A et B), une réorganisation des protéines contractiles dans les unités des sarcomères et une augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  due à une

diminution de l'expression de SERCA2a [289]. La synthèse des mitochondries représente également un événement cellulaire précoce suite à l'initiation de l'hypertrophie, afin de potentiellement compenser la demande d'énergie des cardiomyocytes hypertrophiés [290]. Cette phase compensatrice du cœur est initialement bénéfique puisqu'elle contre la disproportion entre l'augmentation nécessaire du travail du ventricule gauche et la masse cardiaque disponible. Par contre, à long terme, l'augmentation de la dépense énergétique et l'apparition d'une dysfonction diastolique conduisent à l'insuffisance cardiaque [290]. Cette dysfonction diastolique se manifeste par une diminution de la capacité de relaxation subséquente au développement d'anormalités intrinsèques de la fonction contractile et de la structure, mais est également attribuable à l'augmentation de la fibrose interstitielle et à la rigidité subséquente de la paroi [291].

**3. Fibrose réactive** Au cours de l'hypertension artérielle, la matrice extracellulaire se répand au niveau du système cardiovasculaire, ce qui est caractéristique de la fibrose réactive et réparatrice [292]. Le collagène de type I et III s'accumule en premier lieu autour des artères coronaires intramyocardiques (fibrose périvasculaire) pour ensuite s'étendre entre les cardiomyocytes (fibrose interstitielle) et constitue la fibrose réactive [293, 294]. L'épaississement de la matrice autour des cardiomyocytes diminue éventuellement leur apport en oxygène parallèlement à l'augmentation du travail cardiaque requise en réponse à l'hypertension systémique. Ce mésappariement cause la mort cellulaire, par nécrose et apoptose. Ainsi, les fibroblastes locaux synthétisent de la nouvelle matrice dans l'optique de remplacer les cardiomyocytes endommagés, formant une cicatrice; ce processus est appelé fibrose réparatrice [295]. Deux mécanismes distincts sont à l'origine de l'initiation de la fibrose périvasculaire : la stimulation hémodynamique et la stimulation non-hémodynamique.

Cause hémodynamique L'application d'une surcharge mécanique sur des vaisseaux en système isolé peut directement stimuler l'augmentation du métabolisme des protéines de la matrice extracellulaire [296]. En effet, l'exposition des cellules endothéliales à une augmentation de pression est à l'origine d'une transmission de l'information aux cellules musculaires lisses sous-jacentes via la production et la libération de substances vasoactives,

ainsi que de facteurs de croissance tel TGF- $\beta$  [297]. L'ET-1 constitue une des substances sensibles à la pression, tel que démontré par l'élévation de sa production *in vitro* en présence d'une augmentation cyclique de la pression [298-300]. De fait, en plus de son effet vasoconstricteur, l'ET-1 induit une prolifération des fibroblastes ainsi que des cellules musculaires lisses sous-jacentes, et présente des propriétés chémoattractantes. Ainsi, les facteurs libérés stimulent le remodelage vasculaire afin de compenser l'élévation de la pression contre la paroi.

Cause non hémodynamique Divers agents vasoactifs extracellulaires sont responsables de l'hypertension artérielle secondaire, incluant l'Ang II, L'ET-1 et l'absence de NO. Puisque ces derniers possèdent pour cible les cellules endothéliales, musculaires lisses sous-jacentes et inflammatoires, il est suggéré que ces substances vasoactives soient à la source du développement de la fibrose périvasculaire [294]. La participation des cellules endothéliales activées dans le remodelage vasculaire hypertensif a largement été documentée. Plusieurs études ont démontré que ces dernières sont impliquées dans la liaison et la migration des cellules inflammatoires dans les tissus. À titre d'exemple, Haudenschild et ses collègues ont décrit une augmentation de l'interaction entre les cellules inflammatoires et les cellules endothéliales activées chez les rats DOCA-hypertendus [301]. Cette même observation a été retrouvée chez les rats Dahl sensibles au sel [302] ainsi que chez les rats spontanément hypertendus [303, 304].

La présence des cellules inflammatoires au niveau tissulaire est le résultat de la présence à la surface endothéliale de ICAM-1 et VCAM-1, ainsi que de MCP-1 au niveau de la média [305]. L'expression de ces molécules d'adhésion peut être la conséquence d'une diminution du facteur anti-inflammatoire NO [306, 307] ainsi que d'une augmentation du peptide ET-1 [298-300] et de l'hormone pro-inflammatoire Ang II [308]. En effet, l'inhibition de la eNOS augmentait davantage l'accumulation des cellules inflammatoires au niveau sous-endothélial [306, 307]. De plus, chez les rats spontanément hypertendus, l'accumulation subcellulaire des lymphocytes T et des macrophages [303, 304] est renversée par l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine [308].

- L'Ang II peut également agir indirectement afin d'induire l'expression des molécules d'adhésion, par la diminution de la synthèse du NO. Ce peptide est un puissant activateur de la NAD(P)H oxydase [201, 309], soit la principale enzyme prooxydante vasculaire. Ainsi, l'augmentation de la concentration plasmatique d'Ang II combinée à celle de l'expression de l'oxydase chez les sujets hypertendus peut être à l'origine de la surproduction d'espèces réactives oxygénées vasculaires [310]. L'augmentation de cette production vasculaire d'anion superoxyde entraîne une diminution de la biodisponibilité du NO en neutralisant directement ce facteur relaxant [206]. Également, l'interaction de ces deux molécules génère le peroxy-nitrite, soit une espèce réactive oxygénée impliquée dans le découplage fonctionnel de la eNOS; l'altération subséquente de son activité est responsable de la synthèse de l'anion superoxyde au détriment de celle du NO [4]. Ainsi, l'action anti-inflammatoire induite par la présence du NO est réduite.

Les cellules inflammatoires localisées au niveau sous-endothélial sont à l'origine de la libération de TGF- $\beta$  [311], de PDGF ainsi que de diverses cytokines profibrotiques [295]; ces dernières stimulent la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. L'Ang II et l'ET-1 possèdent également une action au niveau des fibroblastes, stimulant directement leur prolifération suite à la liaison respective des récepteurs AT<sub>1</sub> et ET<sub>A</sub> exprimés à la surface cellulaire [312-314]. Les myofibroblastes sont responsables de la génération de fibrose grâce à leur capacité de sécréter des protéines de la matrice extracellulaire, générant le collagène périvasculaire [315]. Ainsi, en présence d'hypertension artérielle, la fibrose périvasculaire est le résultat d'une augmentation de la synthèse du collagène, conjointement à une diminution ou une absence de changement au niveau de la dégradation de ce dernier par les collagénases [316, 317].

**ATHÉROSCLÉROSE** La dysfonction endothéliale vasculaire est également à la source du développement d'athérosclérose dans les zones de haute turbulence [318]. Dans un premier temps, cette altération endothéliale facilite l'attachement des monocytes à la surface luminale car l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion est levée subséquemment à la diminution de la synthèse du NO et à l'augmentation de la génération des espèces réactives oxygénées [306, 307]. Parallèlement, il se produit une pénétration

passive suivie d'une accumulation des LDL au niveau des CE [319-321]. Puisque ce phénomène est proportionnel à la concentration plasmatique de LDL, il est largement augmenté en présence d'une hyperlipidémie. Les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales ainsi activées génèrent davantage d'espèces réactives oxygénées et ces dernières induisent des modifications oxydatives des LDL ainsi que la destruction des récepteurs impliqués dans le nettoyage des LDL [322]. Les LDL oxydées sont absorbées via les récepteurs de récupération leucocytaires, induisant la formation de cellules spumeuses [323]. Ces cellules migrent vers l'espace sous-endothélial et forment, avec les lymphocytes T, des stries lipidiques [324]. Par la suite, les plaquettes, macrophages et cellules endothéliales libèrent des cytokines responsables de la prolifération des CML et des fibroblastes [325]. Une capsule fibreuse entourant les cellules spumeuses et les débris nécrotiques est ainsi déposée et forme la plaque athéromateuse [326].

De nombreuses complications de l'athérosclérose peuvent survenir. Dans un premier temps, il peut se produire une rupture de la plaque suivie de la formation locale d'un thrombus [327]. Cette rupture peut être secondaire à une situation extrinsèque, telle l'hypertension artérielle, mais résulte essentiellement d'une cause intrinsèque nommée vulnérabilité de la plaque. Les deux facteurs prédominants de cette vulnérabilité sont : 1) la quantité de macrophages spumeux, et 2) l'inflammation de la matrice fibreuse [326]. Ainsi, le thrombus artériel formé suite à la rupture de la plaque progresse vers le centre de la lumière vasculaire, provoquant une occlusion partielle ou complète de la lumière. Il s'en suit respectivement une ischémie chronique ou aiguë et peut ultérieurement mener vers un infarctus [327-330]. La sténose artérielle peut toutefois se produire par une évolution de la plaque stable, suite à une progression parallèle vers le centre de la lumière vasculaire du centre lipidique et de la capsule fibreuse. Finalement, le thrombus peut également se détacher et être à la source d'une embolie cérébrale [331].

### **3. INFARCTUS DU MYOCARDE**

L'infarctus du myocarde survient suite à l'occlusion complète d'une artère coronaire, cette dernière étant entre autres induite par un thrombus, un spasme artériel ou une rupture de plaque athéromateuse. Par contre, indépendamment du mécanisme originel, l'ischémie induit un déséquilibre entre l'apport et la demande d'oxygène nécessaire pour le métabolisme des substrats dans le tissu cardiaque. Ceci mène rapidement à de nombreuses altérations fonctionnelles, métaboliques, électrophysiologiques et morphologiques du myocarde qui peuvent éventuellement induire une nécrose cellulaire de la zone normalement nourrie par cette artère [332]. La reperfusion du myocarde ischémique est associée à un éventail d'altérations pathophysiologiques, incluant les arythmies de reperfusion, la dysfonction mécanique transitoire ou prolongée du myocarde, et la mort cellulaire. L'augmentation radicale des espèces réactives oxygénées ainsi que la surcharge et la redistribution des ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont responsables de ces diverses manifestations pathologiques [333]. La reperfusion du myocarde induit toutefois une réponse inflammatoire davantage prononcée, accélérant ainsi la réponse réparatrice comparativement à l'insulte ischémique seule.

**1. Remodelage cicatriciel** Les processus de réparation de la section du myocarde ayant subi une insulte sont initiés par la phase inflammatoire aiguë, largement contrôlée aux niveaux temporel et spatial par l'expression coordonnée des cytokines, des molécules d'adhésion cellulaires, des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extracellulaire. Au cours de la phase précoce, le recrutement des neutrophiles et des monocytes contribue au nettoyage des cardiomyocytes nécrotiques et des débris matriciels [334]. Subséquemment, un tissu granulaire est formé, consisté de macrophages, de myofibroblastes et de néo-vaisseaux.

- Les macrophages constituent d'importants acteurs de l'infiltrat inflammatoire et sont entre autres responsables du retrait des débris cellulaires, des neutrophiles et des cardiomyocytes nécrotiques [335]. De plus, ils participent au remodelage de la matrice

extracellulaire par la production de métalloprotéinases matricielles (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP) [336, 337]. Finalement, ils représentent une source de sécrétion des cytokines et des facteurs de croissance régulant la différenciation des fibroblastes et l'angiogenèse [338].

- Les fibroblastes qui infiltrent la région infarctée entrent en prolifération et différenciation subséquente en myofibroblastes. Ces modifications cellulaires sont dues à l'action de divers facteurs libérés des leucocytes, incluant principalement le facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2) et TGF $\beta$  [339]. En plus d'augmenter la synthèse des protéines de la matrice et de diminuer l'activité globale des MMP, TGF $\beta$  augmente l'expression des TIMP, favorisant ainsi la préservation de la matrice nouvellement générée [340]. Donc, les myofibroblastes génèrent une activité proliférative intensive, produisant la matrice extracellulaire cicatricielle dans la zone infarctée.

- L'angiogenèse est une composante importante du tissu de granulation et cette formation de nouveaux vaisseaux est requise afin d'apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires au métabolisme des cellules localisées dans la cicatrice. Deux sources possibles d'endothélialisation ont été identifiées 1) l'émergence ou la migration endothéliale d'un vaisseau sanguin adjacent ou 2) la néo-vascularisation par la différenciation des cellules progénitrices endothéliales dérivées de la moelle osseuse. Ainsi, en réponse à l'ischémie, le facteur de transcription HIF1 $\alpha$  est activé et entraîne l'induction du facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) [341]. Les espèces réactives oxygénées générées au cours de la reperfusion, ainsi que plusieurs médiateurs incluant le facteur de croissance des fibroblastes, TGF $\beta$  et diverses chemokines, sont également impliqués dans la réponse angiogénique du myocarde ischémique [342]. En dernier lieu, des fibres sympathiques sont détectées à proximité des vaisseaux sanguins dans la région infarctée et pourraient également participer à l'angiogenèse [343].

- La dénervation sympathique survient subséquemment à l'apoptose des fibres nerveuses [344]. Ainsi, lors de la formation de la cicatrice, une réinnervation se produit par la germination de nouvelles fibres sympathiques suite à la libération du facteur de croissance des nerfs (NGF), libéré entre autres par les myofibroblastes [345]. Les

mécanismes exacts sont décrits à la section suivante (Section *Arythmies cardiaques post-infarctus*, p.56).

Dans la phase finale de maturation, les myofibroblastes de l'infarctus deviennent apoptotiques et le tissu granulaire est remplacé par la cicatrice [346]. Cette région n'est toutefois pas un tissu acellulaire simplement composé de fibres de collagène mais représente plutôt un tissu métaboliquement actif, produisant et accumulant continuellement du collagène.

**2. Remodelage cardiaque** La réparation du cœur infarci est également accompagnée de profondes modifications dans l'architecture et la géométrie ventriculaire [347]. Ces changements cellulaires et moléculaires du remodelage cardiaque affectent la zone nécrotique mais également les segments intacts du ventricule [348]. La surcharge volumique induite suite à l'infarctus du myocarde se manifeste initialement par une dilatation des cavités. Afin de normaliser la tension sur la paroi, une hypertrophie ventriculaire eccentric se développe, phénomène expliqué par la Loi de Laplace. À plus long terme, l'augmentation de la dépense énergétique devient néfaste et se traduit par une détérioration de la fonction cardiaque [349]. En dernier lieu, l'innervation sympathique du cœur non-infarci survient également. Les mécanismes exacts sont décrits à la section suivante (Section *Arythmies cardiaques post-infarctus*, p.56)

**3. Formation cicatricielle chez les gens obèses** Chez les gens obèses, de nombreuses études suggèrent que les remodelages cardiaque et vasculaire post-infarctus sont inadaptés comparativement aux gens avec un poids normal : ceci expliquerait l'augmentation du nombre de récurrences ainsi que de la mortalité plus élevée [350, 351]. Par contre, des divergences subsistent puisque certaines études cliniques ne détectent pas d'augmentation des conséquences post-ischémie chez les sujets obèses [352-354].

De telles controverses existent également au niveau des études expérimentales. Dans un modèle génétique d'obésité et de diabète (*db/db*), l'imposition de l'insulte d'ischémie-

reperfusion (I/R) a dramatiquement augmenté le nombre de décès comparativement au groupe témoin I/R [355]. Par contre, dans un modèle murin d'obésité induite suite à l'administration d'une diète riche en gras, l'imposition d'un épisode d'I/R n'a pas conduit vers une mortalité accrue comparativement aux animaux ayant reçu une diète standard [356]. Toutefois, la taille de la cicatrice ainsi que la masse du ventricule gauche étaient significativement supérieures chez ces animaux obèses résistants à l'insuline. De plus, malgré la taille cicatricielle supérieure et l'élévation de l'expression des trois isoformes de TGF, le contenu cicatriciel en collagène de remplacement était significativement réduit comparativement au groupe témoin I/R, attestant une faiblesse de la paroi infarctée [356]. Une étude réalisée par du Toit et al. a démontré que chez les rats rendus obèses par l'administration d'une diète riche en gras, l'ajout des concentration *in vivo* d'insuline et d'acides gras au milieu de perfusion inhibait le développement d'un infarctus de plus grosse taille comparativement aux animaux ayant reçu une diète standard [5]. Par contre, mise à part cette similitude, la fonction mécanique du myocarde post-I/R était significativement diminuée chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras [5].

Malgré ces divergences aux niveaux de la mortalité et du remodelage cicatriciel, ces études confirment unanimement une élévation de la réponse inflammatoire comparativement aux animaux non-obèses. En effet, la formation cicatricielle est accompagnée d'une augmentation accrue de l'expression des chemokines et cytokines pro-inflammatoires, ainsi que de l'infiltration des macrophages dans le tissu granulaire [356]. Dans un premier temps, ceci pourrait être la conséquence d'une élévation de l'impact du stress oxydant puisqu'il est établi qu'en présence de diabète et d'obésité, la formation des espèces réactives oxygénées est plus élevée [357, 358]. Dans un deuxième temps, en présence de désordres métaboliques dont le diabète et l'hypercholestérolémie, la voie du NO est également diminuée. Cette altération pourrait également être impliquée dans la différence de formation cicatricielle chez les animaux obèses, caractérisée par l'exagération de la dysfonction endothéliale microvasculaire et la déposition de collagène dans le myocarde viable, ainsi que par la diminution de la vascularisation du myocarde infarcté [359].

#### **4. ARYTHMIES CARDIAQUES POST-INFARCTUS**

Près de la moitié des patients qui survivent à un infarctus aigu du myocarde décèdent ultimement d'une mort cardiaque subite due à des arythmies ventriculaires malignes. En effet, la combinaison du remodelage électrique [360] et de l'augmentation rapide de l'activité nerveuse sympathique suite à l'infarctus [361] contribuent au développement de diverses arythmies, incluant la tachycardie ventriculaire. Une étude réalisée par Chen et al. démontre même qu'une interaction entre les deux phénomènes est nécessaire pour produire un modèle canin de tachycardie ventriculaire ou de mort subite, ce qui suggère que les deux mécanismes coexistent également chez l'homme avant la survenue d'arythmie [362].

**1. Hyperinnervation sympathique** La ré-innervation, tel que chez les patients ayant subi une transplantation, est associée à une amélioration de la performance cardiaque à l'exercice. Par contre, l'excès de formation de synapses fonctionnelles peut également se traduire par une altération de l'environnement physiologique, par exemple suite à une insulte ischémique cervicale alors que la formation anormale de terminaisons nerveuses résulte en la génération de crises d'épilepsie. Au niveau cardiaque, l'infarctus du myocarde se traduit initialement par une atteinte quantitative des nerfs sympathiques [344]. Afin de compenser cette perte dans le ventricule infarcté, il se produit une augmentation des fibres sympathiques tant au niveau de la cicatrice que de la région péri-infarctus [363]. La ré-innervation permet une amélioration de la performance hémodynamique du myocarde rescapé. Cependant, une hyperinnervation sympathique peut également se produire et expliquerait en partie l'augmentation de l'incidence d'arythmie chez les patients suite à un infarctus du myocarde [364-367]. Cette hyperinnervation sympathique, caractérisée par une augmentation de l'expression de la protéine associée à la croissance (GAP43) et de l'hydroxylase de la tyrosine (TH), est principalement mais de manière hétérogène localisée au niveau de la zone péri-infarctus [368]. Le mécanisme à l'origine de l'innervation myocardique et cicatricielle se traduit par la germination de fibres sympathiques préexistantes suite au transport rétrograde du facteur de croissance neuronal [369].

Germination des fibres préexistantes La majorité des fibres nerveuses sympathiques efférentes innervant le ventricule gauche est contenue dans le nerf sympathique inférieur gauche, qui provient du ganglion stellaire gauche. Dans un modèle canin d'infarctus du myocarde, l'infusion du NGF dans le ganglion stellaire accélérât et intensifiait la germination nerveuse, résultant en une augmentation de l'incidence de mort subite [362]. Selon Zhou et al., cette stimulation ganglionnaire survient également *in vivo*, caractérisée par l'augmentation locale de l'expression NGF, suivie par son transport rétrograde vers le ganglion stellaire. Le NGF initie et facilite ainsi la germination des fibres neurofilament M<sup>+</sup> [370]. L'élévation de l'expression de NGF est accompagnée de celle d'autres facteurs neurotropiques, incluant le facteur de croissance de l'insuline et les facteurs d'inhibition de la leucémie. Les cellules non-neuronales, telles que les myofibroblastes [345], participent à la libération de ces facteurs de manière prédominante et davantage persistante dans la zone péri-infarctus que dans la zone infarctée *per se* [363].

**2. Remodelage électrique** Au cours de la première semaine suivant l'occlusion d'une artère coronaire, le remodelage myocardique se caractérise par l'augmentation du tissu conjonctif, de la fibrose interstitielle et de l'œdème au niveau épicaudique, ayant pour résultat une anisotropie non-uniforme [347]. En effet, ces manifestations pathologiques sont à la source d'une perturbation de la propagation de l'influx selon l'axe longitudinal des fibres myocardiques secondaire à une diminution du couplage des jonctions intercellulaires. En plus de cette intrusion physique au niveau intercellulaire, l'analyse des tissus myocardiques infarctés humains démontre une diminution et une délocalisation des jonctions intercellulaires (Cx40 et 43). De plus, la suppression de la phosphorylation de Cx43 suite à l'épisode d'ischémie témoigne d'un découplage électrique causant une augmentation de la vulnérabilité à la fibrillation ventriculaire. Ces trois altérations du couplage électrique sont corrélées avec la localisation des circuits de réentrée en bordure de la zone infarctée [371].

- En condition physiologique, l'influx de dépolarisation se propage dans le ventricule et cesse au moment où il rencontre des cellules qui ont déjà été excitées, c'est-à-dire qui sont en période réfractaire. Ainsi, ces cellules ne peuvent être réactivées par un second influx. Par contre, lorsque la durée du potentiel d'action est prolongée ou lorsque la

vitesse de propagation de l'influx entre deux cellules est diminuée, tel qu'en présence de fibrose [372] ou d'une diminution de l'efficacité des jonctions intercellulaires [372, 373], une continuation de la propagation de l'influx peut survenir. Ainsi, l'influx peut survivre plus longtemps puisqu'il ne rencontre aucune cellule en période réfractaire absolue. Le même influx peut alors perdurer au niveau ventriculaire avec une haute fréquence de ré-excitation, indépendamment de l'influx provenant du nœud sinusal et ce mouvement circulaire s'appelle la réentrée [371].

L'hétérogénéité transmurale de repolarisation augmente suite à un infarctus du myocarde, et cette dernière est davantage marquée dans la zone péri-infarctus. Il est proposé que ces changements résultent principalement d'une atteinte variée de l'épicarde, du myocarde et de l'endocarde suite à l'insulte ischémique, tel que rencontré lors d'un infarctus non-transmural [360]. Jiang et al. ont également démontré que la densité de germination des nerfs sympathiques présentait une corrélation positive avec l'hétérogénéité transmurale dans la zone péri-infarctus. Le degré de dispersion de repolarisation augmentait alors que la germination devenait plus excessive. Les mécanismes sous-jacents demeurent toutefois nébuleux. Une des possibilités qui explique la différence de caractéristiques électrophysiologiques serait la divergence de sensibilité au neurotransmetteur norépinephrine. Une seconde possibilité serait la distribution hétérogène de la germination dans les trois couches [368].

Les propriétés actives membranaires en bordure de la zone infarctus sont également rapidement modifiées suite à l'altération de certains canaux ioniques. Plus précisément, l'amplitude maximale des courants  $\text{Ca}^{2+}$  entrants (canaux de type L) est réduite dans les cardiomyocytes isolés de cette zone en bordure et la vitesse d'inactivation des canaux  $\text{Na}^+$  rapides entrants est diminuée [374]. Ces changements de propriétés membranaires mènent à une excitabilité ainsi qu'à une période réfractaire post-repolarisation diminuées, favorisant la réentrée suite à une stimulation prématurée ou rapide [374, 375]. Des modifications significatives surviennent aussi dans le myocarde non-infarcté, incluant la prolongation de la durée du potentiel d'action qui pourrait s'expliquer par la réduction des canaux  $\text{K}^+$  transitoires sortants [348].

L'atténuation des courants  $\text{Na}^+$  responsables de dépolarisation rapide peut mener au développement de la réentrée puisque ces courants retardés résultent en une prolongation du potentiel d'action, favorisant les dépolarisations précoces. Conjointement, l'augmentation des concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  peut être à la source de battements prématurés [376]. Ces derniers sont la conséquence de décharges répétitives qui ne proviennent pas du nœud sinusal mais plutôt des cellules non impliquées dans l'activité pacemaker. Plus précisément, le battement prématuré survient suite au potentiel d'action en présence de concentrations  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaires excessives. Ces dernières activent l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  qui produit un transfert d'un ion calcique à l'extérieur de la cellule en échange de l'entrée de trois ions sodiques[377]. L'influx net d'une charge positive résultant induit la dépolarisation membranaire prématurée. Cette activité pacemaker ectopique supportée par l'activité sympathique survient au cours d'une période d'ischémie et favorise la tachycardie ventriculaire [378].

**3. Facteurs de prédisposition chez les gens obèses** Ainsi, de nombreuses modifications surviennent suite à l'infarctus du myocarde, induisant une augmentation du risque d'arythmies ventriculaires à plus long terme. L'arythmie ventriculaire peut toutefois également survenir à court terme, induite par la combinaison de la perturbation membranaire des cardiomyocytes, des déséquilibres métaboliques et des altérations neurales autonomiques. De manière complémentaire à ces modifications pathologiques aiguës, de nombreuses études ont démontré que diverses perturbations physiologiques survenant en présence d'obésité contribuent à la mort subite peu après l'ischémie.

L'abondance ainsi que la localisation cellulaire des Cx est altérée en présence de diverses conditions pathologiques, incluant l'hypertrophie, l'hypertriglycéridémie, le syndrome métabolique, l'insuffisance cardiaque et les maladies ischémiques. Dans un modèle d'hypertension chez le rat, induite par l'administration de L-NAME, ainsi que chez les patients présentant une sténose aortique sévère, l'expression de la Cx43 contenue dans les jonctions intercellulaires était significativement réduite [379] [380]. Par contre, de manière contradictoire, dans le cœur hypertrophié des rats spontanément hypertendus [381] ainsi que des rats avec une hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline [382], l'expression de la connexine 43 était augmentée et couplée à une désorganisation de la

distribution de cette protéine. Cette augmentation des jonctions latérales aux dépens des jonctions longitudinales favorise la tendance à l'arythmie [381]. Ceci est appuyé par la démonstration que les souris déficientes en Cx43 myocardique présentaient une diminution marquée de la conduction, ce qui facilitait les arythmies de réentrée et la mort subite [383]. Ainsi, la modulation des Cx43 peut varier en fonction de l'espèce, du moment de l'analyse et du modèle d'induction de l'hypertension mais son expression semble toutefois altérée dans tous les cas, augmentant le risque d'arythmies.

La fibrose interstitielle dans les ventricules hypertrophiés et dans le cœur des rats diabétiques est à l'origine d'une diminution du couplage des jonctions intercellulaires, altérant ainsi la propagation de l'influx. Également, en plus d'être responsable de la formation de la fibrose, les myofibroblastes activés en présence d'une hypertension possèdent la capacité de générer le NGF [345]. Dans un modèle d'hypertension pulmonaire induite par l'injection de monocrotaline, le niveau de NGF était élevé dans le ventricule droit hypertrophié et associé à une hyperinnervation. Toutefois, les neurones synthétisent une quantité moindre de norépinephrine à cause d'une diminution de l'expression de TH et de la recapture de la norépinephrine. Ces variations étaient accompagnées d'une augmentation de l'expression du marqueur de neurones immatures, soit PSA-NCAM (forme polysialique des molécules d'adhésion des cellules neurales), attestant un rajeunissement neuronal [384]. Ceci démontre que malgré l'hyperinnervation, une dépression fonctionnelle peut survenir lors de certaines conditions. De telles observations ont également été démontrées au niveau du ventricule gauche hypertrophié dans un modèle de cerclage aortique [385].

Liu et al. ont démontré que l'hypercholestérolémie secondaire à l'administration d'une diète riche en cholestérol était associée à une augmentation du remodelage neural périphérique [251]. Une forte corrélation a été confirmée entre les niveaux de cholestérol et la densité des nerfs positifs pour GAP43 et TH. Ceci peut être la conséquence directe du cholestérol puisqu'il joue, de manière physiologique, un rôle important dans la synaptogenèse du SNC. D'un autre côté, le stress oxydant associé à la dyslipidémie peut également être impliqué dans la neurodégénération, événement qui induit la réexpression de NGF et autres facteurs neurotropiques [260]. Un remodelage électrophysiologique a

également été démontré, caractérisé par une augmentation de la durée du potentiel d'action, de l'intervalle QTc et de l'hétérogénéité de la repolarisation.

En résumé, l'obésité contribue à l'initiation et/ou au développement de divers états pathologiques perturbant le métabolisme normal, incluant entre autres la dyslipidémie, l'intolérance au glucose et le diabète de type II. De plus, chez les patients diagnostiqués avec un syndrome métabolique, l'hypertension artérielle et les maladies des artères coronaires sont fréquentes, augmentant considérablement le risque subséquent d'infarctus du myocarde. En plus de présenter une susceptibilité accrue à l'infarctus, le risque d'arythmies ventriculaires et de mort subite au cours de l'insulte ischémique est également augmenté, dû à la présence de perturbations cardiaques électrophysiologiques et neurales établies chez les gens obèses [386]. Chez les patients qui survivent à un événement aigu, le risque de mort cardiaque subite due à des arythmies ventriculaires malignes est également élevé à plus long terme, secondaire à remodelage un cicatriciel et cardiaque inadapté [386, 387].

## *CHAPITRE QUATRIÈME :* *TRAITEMENTS ANTIOXYDANTS CONTRE L'OBÉSITÉ* *ET LES ALTÉRATIONS PATHOLOGIQUES ASSOCIÉES*

---

Puisque le stress oxydant est impliqué dans la majorité des pathologies associées à l'obésité les espèces réactives oxygénées représentent une cible de choix pour la prévention du développement de ces altérations. Dans un premier temps, la thérapie peut viser la diminution du stress oxydant par l'administration de traitements inhibiteurs de l'activité pro-oxydante. Dans cette catégorie entrent les antagonistes de AT<sub>1</sub> ainsi que les inhibiteurs de l'ECA, de l'oxydase de la NAD(P)H (apocinine) [388], de la COX (acide acétylsalicylique) et de l'oxydase de la xanthine (allopurinol) [389]. L'augmentation de l'activité antioxydante représente une seconde voie pour l'amélioration du statut oxydant, qui comprend entre autres les suppléments d'antioxydants endogènes (dismutase du superoxyde, catalase et peroxydase du glutathion), les vitamines C et E, la N-acétylcystéine, les statines et le RES.

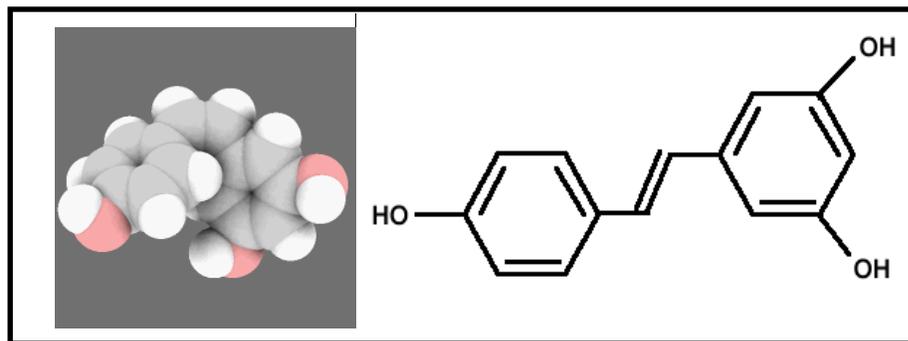
**RESVÉRATROL** Récemment, de nombreuses études épidémiologiques et évidences cliniques ont établi une relation entre la consommation de vin rouge et l'incidence de mortalité et morbidité secondaire aux maladies cardiovasculaires. Puisque le phénomène a initialement été décrit chez les populations de la Méditerranée et du sud de la France, cette observation a mené à l'appellation populaire «Paradoxe français» [390]. Le RES a été identifié comme étant un des agents responsables de la corrélation inverse entre la consommation prolongée de vin rouge et la survenue d'évènements cardiovasculaires néfastes [391].

Puisque le RES est un composé liposoluble absorbé dans les tissus [392], seule une consommation modérée et prolongée mène à une accumulation de quantités biologiquement actives pour expliquer les effets bénéfiques du vin rouge sur la santé [393]. Les concentrations de *trans*-RES varient grandement d'une sorte de cépage à l'autre. Avec une valeur moyenne de 5 mg·l<sup>-1</sup> [394, 395] et une consommation quotidienne de 375 ml (ou environ 2 coupes de vin), une personne de 70 kg recevrait une dose d'environ 27 µg·kg<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup>

[396]. Au niveau plasmatique, la concentration maximale atteinte avec cette dose correspond à environ 2,4 nM [396]. À dose plus élevée, les effets néfastes de l'alcool masqueraient les bénéfices au niveau de la santé. À titre d'exemple, l'effet bénéfique de la consommation d'alcool sur la maladie d'Alzheimer est maximal avec 1 à 6 verre(s) par semaine [397] alors que l'ingestion de plus de 4 verres par jour élimine l'effet bénéfique de l'alcool par une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires [398].

Les actions favorables du RES sont nombreuses, incluant des propriétés anti-cancéreuses (inhibition de l'initiation, de la promotion et de la propagation), anti-inflammatoires, anti-plaquettaires, anti-athérosclérotiques. De plus, il agit à titre de mimétique de la restriction calorique via l'activation de Sirt-1 [399] et d'agent de pré-conditionnement cardiaque via l'activation du NO et de l'adénosine. Également, en relation avec le présent projet, le RES présente des propriétés antioxydantes, anti-arythmiques, anti-fibrotiques et de régulation du tonus vasomoteur.

**1. Propriétés antioxydantes** La configuration des 2 groupements phénols (Figure 5) confère au RES de puissantes propriétés antioxydantes, confirmées par l'augmentation des lignes de défenses antioxydantes ainsi que par la neutralisation directe de certaines espèces réactives oxygénées.



**FIGURE 5.** Resvératrol ou *trans* 3,4',5-trihydroxystilbène

Des études *in vitro* réalisées par Cao et Li sur des cardiomyocytes [400] et par Li et al. sur des CML aortiques [401] ont démontré que des concentrations micromolaires de RES induisaient une augmentation du contenu cellulaire en glutathion réduit et de l'activité de différentes enzymes, dont celles dépendantes du glutathion (GPx ainsi que la réductase et la transférase du glutathion), la catalase et la dismutase du superoxyde. L'augmentation du contenu en glutathion suite à une incubation avec 10 et 50  $\mu\text{M}$  de RES a également été démontrée dans les cellules musculaires lisses vasculaires isolées de rats spontanément hypertendus [402] et dans les cellules endothéliales aortiques bovines stimulées avec le peroxy-nitrite, respectivement [403]. Suite à un stress provoqué par les LDL oxydés et le  $\text{TNF}\alpha$  au niveau des cellules endothéliales, l'action anti-apoptotique du RES (10  $\mu\text{M}$ ) est partiellement inhibé par le mercaptosuccinate, un inhibiteur de la peroxydase du glutathion [404]. L'effet antioxydant du RES semble se situer majoritairement au niveau de l'augmentation des défenses antioxydantes, tel que suggéré par le manque d'effet de neutralisation directe des espèces réactives oxygénées. De fait, le pré-traitement de 2h des cardiomyocytes en culture avec le RES (100  $\mu\text{M}$ ) n'a pas prévenu l'apoptose de ces dernières, secondaire à la cytotoxicité induite par l'incubation de la XO avec son substrat xanthine [400], alors que le pré-traitement de 72h a significativement inhibé la mort cellulaire.

Des études *in vivo* ont également démontré la capacité antioxydante du RES. Chez le rat, le traitement chronique (10 et 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  PO pour une période de 25 jours) débutant 4 jours avant une injection intra-cérébroventriculaire de colchicine a significativement diminué les niveaux de malondialdéhyde (un marqueur du stress oxydant) et rétabli les réserves de GSH [405]. Au niveau des oreillettes, la production d'espèces réactives oxygénées par une administration de ménadione a été significativement réduite chez les cobayes ayant reçu un traitement oral chronique de RES (60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  PO pour une période de 16 jours). Ceci serait la conséquence d'une augmentation de l'activité de la catalase. Toutefois, alors que l'effet antioxydant a été prouvé *in vitro* contre les radicaux hydroxyl, Turrens et ses collègues ont démontré que l'effet *in vivo* n'était pas équivalent. En effet, suite à une administration de RES (20 et 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  intrapéritonéal pour 21 jours) à des rats normaux, la peroxydation des lipides n'a pas été prévenue, tel que confirmé par la présence de substances réactives d'acide thiobarbiturique (TBARS) [406].

**2. Régulation du tonus vasomoteur** Le RES présente des mécanismes d'action hétérogènes au niveau vasculaire, induisant des relaxations dépendantes et indépendantes de l'endothélium. Suite à la dénudation aortique de l'endothélium ou en présence de L-NNA, un inhibiteur de la eNOS, des concentrations supérieures à  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  induisent une vasorelaxation par une action musculaire. Par ailleurs, en présence d'endothélium, la relaxation est induite à des concentrations inférieures à  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  [407], subséquemment à une action transcriptionnelle ou membranaire du RES.

**Relaxations dépendantes de l'endothélium** Le RES possède deux cibles principales afin de moduler les relaxations dépendantes de l'endothélium. Dans un premier temps, il a été démontré au niveau des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine que l'antioxydant ( $30 \mu\text{M}$ ) agit au niveau des canaux  $\text{K}^+$  de grande conductance activés par le  $\text{Ca}^{2+}$ , augmentant l'amplitude de l'efflux de  $\text{K}^+$  et générant une hyperpolarisation endothéliale. La modification de la cinétique d'ouverture des canaux se traduit par une diminution du temps de fermeture et une prolongation de la durée d'ouverture [408]. Ainsi, l'hyperpolarisation de la membrane augmente les forces d'entrée des cations dans les CE, et par le fait même l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$ . Il s'en suit une activation de la eNOS et une relaxation vasculaire subséquente induite par l'action des facteurs relaxants sur les CML sous-jacentes [167, 168]. Également, l'élévation des concentrations intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  crée une rétroaction positive sur les canaux augmentant ainsi l'efflux de  $\text{K}^+$  et l'hyperpolarisation consécutive [409].

Dans un deuxième temps, l'incubation de  $10 \mu\text{M}$  RES pour une période de 24 heures avec les CE ombilicales humaines augmente l'expression de la eNOS, par un mécanisme indépendant des récepteurs aux œstrogènes. Cette modulation implique des mécanismes transcriptionnels (activation de la partie proximale du promoteur de eNOS) ainsi que post-transcriptionnels (stabilisation de l'ARNm) [410]. Par contre, Klinge et al. ont démontré au niveau des CE aortiques bovines que cette capacité à augmenter l'expression de l'enzyme est dépendante de ses propriétés œstrogénique [411]. En présence de quantités de l'ordre du nanomolaire, le RES active une MAPK qui phosphoryle le récepteur aux œstrogènes  $\text{E}_2$  (Ser<sup>118</sup>); l'activation non-génomique subséquente de la eNOS est comparable à celle induite par l'estradiol. Une troisième possibilité est que le RES peut activer les ligands du PPAR- $\gamma$

au niveau des CE [412] et être à la source de l'induction de la vasorelaxation car les PPAR- $\gamma$  possèdent la capacité d'activer l'enzyme eNOS.

Wang et ses collègues ont toutefois démontré que les concentrations de RES jouent un rôle majeur au niveau de l'expression de la eNOS. Suite à une insulte au niveau de l'intima aortique, l'administration d'une haute dose de RES (50 mg·kg<sup>-1</sup>) n'a pas amélioré la réendothélialisation ni augmenté l'expression de la eNOS. Toutefois, la faible dose (10 mg·kg<sup>-1</sup>) a présenté un impact bénéfique au niveau des 2 paramètres. Cette expression différée de la eNOS a également été démontrée dans les cellules progénitrices humaines, où la faible dose (1  $\mu$ M) favorisait l'expression de l'enzyme et la forte dose (60  $\mu$ M) n'a eu aucun effet [413].

**Relaxations indépendantes de l'endothélium** À des concentrations élevées, le RES est à la source d'une vasorelaxation par une action directe sur les CML sous-jacentes. En premier lieu, au niveau des artères coronaires porcines isolées, l'antioxydant (100  $\mu$ M) agit comme antagoniste des canaux Ca<sup>2+</sup> dépendants du voltage; l'influx calcique dans les CML est inhibé, ainsi que la contraction subséquente [414]. Une seconde étude portant sur l'implication des canaux Ca<sup>2+</sup> a plutôt démontré que l'induction des relaxations indépendantes de l'endothélium par le RES (0,1 mM) est la conséquence d'une diminution de la sensibilité des myofilaments au Ca<sup>2+</sup> [415].

Le RES possède également une action sur les canaux K<sup>+</sup> musculaires. Le type exact de canal semble toutefois varier selon le lit vasculaire et l'espèce étudié. Certains chercheurs impliquent une participation des canaux K<sup>+</sup> activés par le Ca<sup>2+</sup>, de petite ou grande conductance [416], alors que d'autres suggèrent divers sous-types des canaux dépendants du voltage suite à une stimulation avec une concentration de 100  $\mu$ M [417]. Finalement, le RES est un activateur direct de la guanylate cyclase particulaire et entre en compétition avec le peptide natriurétique auriculaire pour la formation du GMPc [418]. Ainsi, suite à l'activation de l'enzyme membranaire par l'antioxydant, l'élévation de la concentration de GMPc (EC<sub>50</sub> 1,8  $\mu$ M) est responsable de l'inhibition de la machine contractile.

Alors que la grande majorité des études évaluant les effets vasodilatateurs du RES a été réalisé *in vitro* (cultures cellulaires) ou *ex vivo* (chambre d'organe), quelques unes seulement ont caractérisé son potentiel suite à une administration *in vivo* chronique. Chez le rat sain, l'administration du RES (50 mg·L<sup>-1</sup> PO pour 21 jours) a potentialisé les relaxations aortiques dépendantes et indépendantes de l'endothélium induites par l'œstrogène [419]. Cette augmentation était associée à une élévation de la production de nitrite/nitrate ainsi qu'à une diminution de la production basale et stimulée d'anion superoxyde. Chez le rat rendu diabétique suite à une injection de streptozotocine, le RES (5 mg·kg<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> pour 21 jours) a prévenu l'augmentation significative des contractions à la norépinéphrine et la diminution des relaxations à l'ACh [420].

**3. Propriétés antiarythmiques** L'élévation des concentrations intracellulaires de Ca<sup>2+</sup> est à l'origine de la propagation d'ondes à partir du réticulum sarcoplasmique qui résulte en une dysfonction contractile et en diverses arythmies [421]. Indépendantes des influx membranaires de Ca<sup>2+</sup>, ces ondes induisent également une surcharge calcique qui est à la source de dommages irréversibles au niveau des cardiomyocytes et représente une cause fréquente de mort cellulaire. Un des effets antiarythmiques du RES est lié à une inhibition de ces canaux cationiques dépendants du voltage. Liu et al. ont de fait démontré que le RES (15-60 µM) modifie la cinétique d'ouverture des canaux Ca<sup>2+</sup> dépendants du voltage de type L au niveau des cardiomyocytes en culture, en plus d'inhiber la libération du Ca<sup>2+</sup> à partir du réticulum sarcoplasmique [421]. Le RES (100 µM) antagonise également les courants Na<sup>+</sup> provenant des canaux dépendants du voltage, d'une manière dépendante de la concentration mais non de la fréquence [422, 423]. Ceci prévient l'accumulation intracellulaire de Na<sup>+</sup> résultant de la dysfonction des canaux dépendants du voltage, tel que rencontré suite à une insulte d'I/R (Section *Arythmies cardiaques post-infarctus*, p.56). Ainsi, la surcharge de Ca<sup>2+</sup> subséquente au fonctionnement inverse de l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> est prévenue. Conjointement à l'action au niveau des canaux cationiques dépendants du voltage, il a été démontré que le RES prévenait la délocalisation et l'atteinte fonctionnelle des jonctions intercellulaires, démontrant ainsi un second aspect de son potentiel antiarythmique. En effet, dans un modèle d'ischémie-reperfusion sur le cœur isolé

de rat, l'administration de RES a prévenu le développement des altérations de phosphorylation et de distribution spatiale de la Cx43 induits par l'insulte [424].

Chez le rat anesthésié, l'administration de 3 doses différentes de RES (5, 15 et 45 mg·kg<sup>-1</sup>) a prévenu l'induction des arythmies ventriculaires, suite à une injection d'aconotine ou à une occlusion des artères coronaires. En effet, les doses d'aconotine requises pour générer des altérations du rythme à l'ECG étaient significativement supérieures en présence des 3 doses de RES comparativement aux contrôles. Également, la durée et l'incidence des arythmies ainsi que la mortalité secondaire aux arythmies étaient significativement inférieures comparativement aux contrôles en présence de l'occlusion [425]. Le même groupe de chercheurs a démontré que chez le cobaye anesthésié, l'administration des 3 doses de RES (5, 15 et 45 mg·kg<sup>-1</sup>) prévenait l'induction des arythmies ventriculaires provoquées par l'injection de oubain [425].

**4. Propriétés antifibrotiques** Le RES est un agent antifibrotique, tel que démontré par l'inhibition de deux étapes clés du développement de la fibrose cardiaque. Dans un premier temps, RES (5-25 µM) limite la prolifération des fibroblastes en culture par l'atténuation de la voie de signalisation de ERK 1/2. Dans un deuxième temps, il inhibe la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes par la prévention de l'action du facteur de croissance TGF-β3 [426]. Au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires isolées des aortes de rats spontanément hypertendus, le RES (0,1-10 µM) inhibe la synthèse du collagène et l'augmentation de l'ARNm de TGF-β1 d'une manière dépendante de la concentration [402]. Les propriétés anti-fibrotiques du RES ont également été démontrées chez les modèles expérimentaux soumis à une insulte d'ischémie-reperfusion. Plusieurs expériences en cœur isolé ont confirmé que l'injection de RES (10 µM) avant l'imposition de l'ischémie diminuait significativement la taille de la cicatrice chez le rat comparativement au groupe témoin [427-430]. Cette observation était accompagnée d'une diminution de l'apoptose des cardiomyocytes ainsi que d'une amélioration de la fonction contractile post-reperfusion. Les mêmes conclusions ont été tirées suite à l'administration de RES 15 minutes avant l'ischémie-reperfusion réalisée à cœur ouvert chez le rat (10 µM) [431] et chez la souris (10 µM) [432]. Par contre, ces dernières études n'ont pas été reproduite par

Hale et ses collègues, et ce malgré la présence de conditions similaires. Suite à l'administration de RES à faible ( $0,15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ou à forte dose ( $1,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), la taille de la zone à risque ainsi que les paramètres hémodynamiques n'étaient pas respectivement diminués et augmentés comparativement aux animaux contrôles [433].

Chez le rat hypercholestérolémique soumis à une insulte d'ischémie-reperfusion (30 d'occlusion et 120 minutes de reperfusion), l'administration chronique de RES ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  pour 2 semaines) a significativement diminué la taille de la cicatrice comparativement au groupe témoin, conjointement à une amélioration de la fonction ventriculaire et une diminution de l'apoptose des cardiomyocytes [434]. Toutefois, cet effet bénéfique *in vivo* n'a pas été retourné chez les rats femelles ayant reçu un traitement de RES  $17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  pour 13 semaines, débutant une semaine avant l'insulte. Chez ces dernières, la détérioration de la fonction hémodynamique et l'augmentation de l'expression de TGF- $\beta$ 1 n'ont pas été prévenues et la taille de la cicatrice n'a pas été réduite par le traitement au RES [435].

**RÉSULTATS CLINIQUES DES TRAITEMENTS ANTIOXYDANTS** Malgré le fait que les données provenant des modèles expérimentaux et des études *in vitro* chez l'homme démontrent sans contredit le potentiel bénéfique du RES, il peut en être autrement pour l'administration chronique chez l'homme. À ma connaissance, aucune étude clinique randomisée et contrôlée n'a encore évalué son effet au niveau cardiovasculaire, nous laissant ainsi sans réponse pour l'instant. Par contre, les données des études et essais cliniques portant sur les antioxydants mettent en doute un effet bénéfique omniprésent.

Dans un essai clinique contrôlé, randomisé et réalisé en double aveugle, l'administration conjointe des antioxydants vitamines C et E cause une diminution significative de la pression artérielle chez les patients hypertendus. Une augmentation de la capacité antioxydante sérique a également été démontrée, tel qu'appuyé par une augmentation du ratio GSH/GSSG [436]. Alors que l'administration de la flavonoïde quercétin ( $730 \text{ mg}\cdot\text{j}^{-1}$ ) pour 28 jours n'a apporté aucune baisse de la pression sanguine chez les gens normotendus, son impact était significatif chez les patients hypertendus, diminuant les pressions artérielles moyenne, systolique et diastolique [437]. Au niveau de l'athérosclérose chez l'homme, il a été démontré que la consommation de thé était

inversement associée à la survenue de maladies coronaires; cet effet protecteur est attribuable entre autre à la propriété antioxydante des polyphénols contenus dans le breuvage [438].

Toutefois, de nombreuses études vont à l'encontre de ces dernières conclusions. Une des plus grandes études impliquant 20 536 patients qui présentaient un risque cardiovasculaire élevé n'a démontré aucune réduction de la pression sanguine après 5 ans de traitement à l'aide de l'acide ascorbique, de la vitamine E synthétique, et de la  $\beta$ -carotène. De plus, malgré l'augmentation substantielle des concentrations plasmatiques des vitamines administrées, la diminution significative de la mortalité et de la morbidité de causes cardiovasculaires suite à ces 5 années n'a pas été démontrée [439]. De manière similaire, l'étude *Primary Prevention Project – Hypertension* n'a pas démontré de diminution significative de la pression artérielle chez les patients hypertendus [440]; l'administration chronique de la vitamine E a même été associée à une augmentation de la mortalité de toute cause [441].

Malgré l'association inverse entre les niveaux plasmatiques de  $\beta$ -carotène et le risque de développement de l'hypertension chez l'homme, l'étude *Supplément en Vitamines et Minéraux Antioxydants* n'a révélé aucun effet bénéfique de l'administration de faibles doses d'antioxydants dans une étude randomisée qui s'est étendue sur une période de 6,5 ans [442]. Également, dans l'étude HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*) impliquant des patients avec des complications d'athérosclérose ou de diabète, la vitamine E (400 UI par jour) n'a induit aucune réduction de la pression artérielle ainsi que de la mortalité et de la morbidité de toute cause [443].

Plusieurs facteurs ont été identifiés comme étant de potentielles causes expliquant l'échec du traitement antioxydant, tel que le type d'antioxydant utilisé, la dose, la durée de traitement ainsi que les propriétés pro-oxydantes d'un dosage particulier. L'hétérogénéité des sujets enrôlés dans les essais cliniques représente un facteur défavorable additionnel qui peut avoir négativement influencé les résultats du traitement antioxydant chez les populations présentant des pathologies cardiovasculaires. Certains auteurs ont également rapporté qu'une réelle augmentation du stress oxydant n'avait jamais été démontrée chez les patients n'ayant pas répondu au traitement antioxydant [444, 445]; de fait, aucune étude

multicentrique n'a été réalisée chez les patients recrutés sur la base d'une présence élevée d'espèces réactives oxygénées.

## *CHAPITRE CINQUIÈME : HYPOTHÈSES ET BUTS*

---

Qu'elle soit acquise ou héréditaire, l'obésité est liée à l'augmentation du risque de résistance à l'insuline (diabète de type 2), d'intolérance au glucose, de dyslipidémie ainsi que d'hypertension artérielle systémique. L'ensemble de ces manifestations constitue le syndrome métabolique, un état pathologique qui augmente significativement le risque d'évènements cardiovasculaires. Au niveau vasculaire, le stress oxydant contribue au développement de l'état hypertendu et de la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium chez les modèles expérimentaux et les patients obèses, par une diminution de la biodisponibilité du facteur relaxant NO. De plus, la combinaison de l'hypertension artérielle et du stress oxydant contribue à la formation de la fibrose cardiaque, périvasculaire et interstitielle. Au niveau cardiaque, en plus de représenter un facteur risque pour l'infarctus du myocarde, l'obésité mène à l'expansion et l'amincissement de la cicatrice, tel que démontré dans les modèles expérimentaux d'obésité soumis à une insulte d'ischémie-reperfusion. Cette réponse fibrotique cicatricielle altérée prédispose par la suite le cœur au remodelage inapproprié et ultimement à l'insuffisance cardiaque. Ces patients obèses qui ont subi un infarctus du myocarde présentent conjointement une élévation du taux d'arythmies cardiaques et de mort subite.

Malgré la relation univoque entre l'obésité établie et les maladies cardiovasculaires, il demeure toutefois indéterminé si des modifications cardiovasculaires néfastes surviennent avant l'établissement d'un gain significatif de la masse corporelle et d'un changement au niveau du profil lipidique. Dans cette optique, la présente étude a testé l'hypothèse générale qui stipule que l'administration d'une diète riche en gras (42 % lipides, kcal) pour une période de 8 semaines chez les rats femelles Sprague-Dawley influence négativement la fonction et le remodelage cardiaque, avant le développement de l'obésité et en absence d'hyperlipidémie et d'hyperglycémie. Plus précisément, les hypothèses suivantes ont été évaluées: 1) les relaxations vasculaires dépendantes de l'endothélium sont altérées, concomitamment à une augmentation de la pression artérielle systolique, 2) la fonction cardiaque est compromise, associée à un remodelage ventriculaire (hypertrophie et fibrose),

3) le stress oxydant est impliqué dans le développement des manifestations néfastes cardiovasculaires puisqu'un traitement antioxydant chronique avec le resvératrol (RES) peut limiter leur évolution, et 4) la réponse cardiaque suite à un infarctus du myocarde est altérée (formation cicatricielle, remodelage cardiaque [ANP, SERCA2], prédisposition aux arythmies ventriculaires).

## *CHAPITRE SIXIÈME :* *PREMIÈRE ÉTUDE*

---

### **Female Rats Fed a High-Fat Diet Were Associated with Vascular Dysfunction and Cardiac Fibrosis in the Absence of Overt Obesity and Hyperlipidemia: Therapeutic Potential of Resveratrol**

Marie-Claude Aubin, Claude Lajoie, Robert Clément, Hugues Gosselin, Angelino Calderone, and Louis P. Perrault

Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada (M.-C.A., A.C., L.P.P.); Department of Science of Physical Activity, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Quebec, Canada (C.L.); Research Center of the Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada (M.-C.A., R.C., H.G., A.C., L.P.P.); Department of Physiology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada (A.C.); and Department of Surgery, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada (L.P.P.)

Received December 5, 2007; accepted March 19, 2008

Copyright © 2008 by the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 135061/3344106

Vol. 325, No. 3, JPET 325:961–968, 2008 *Printed in U.S.A.*

Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.

## Déclaration des co-auteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Claude Aubin inclue l'article identifié ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Étude de la fonction vasculaire et du remodelage cardiaque avant l'établissement de l'obésité et de la dyslipidémie chez les rats femelles recevant une diète riche en gras.

Claude Lajoie

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Robert Clément

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Hugues Gosselin

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Angelino Calderone

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Louis P. Perrault

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

## ABSTRACT

It remains presently unknown whether vascular reactivity is impaired and whether maladaptive cardiac remodeling occurs before the onset of overt obesity and in the absence of hyperlipidemia. Normal female rats were fed a high fat diet for 8 weeks and were associated with a modest but nonsignificant increase of body weight (standard diet, 300±10, versus high fat diet, 329±14 grams) and a normal plasma lipid profile. In rats fed a high fat diet, systolic (171±7 mmHg) and diastolic blood pressures (109±3) were increased compared to a standard diet (systolic blood pressure, 134±8; diastolic blood pressure, 96±5 mmHg), and acetylcholine-dependent relaxation of isolated aortic rings (high fat diet, 22±5%, versus standard diet, 53±8%) was significantly reduced. Furthermore, perivascular fibrosis was detected in the heart of rats fed a high fat diet. The exogenous addition of resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydrostilbene) (0.1 μM) to aortic rings isolated from rats fed a high fat diet restored acetylcholine-mediated relaxation (47±9%). The administration of resveratrol (20 mg/kg/day for 8 weeks) to rats fed a high fat diet prevented the increase in blood pressure and preserved acetylcholine-dependent relaxation of isolated aortic rings. However, resveratrol therapy failed to attenuate the perivascular fibrotic response. These data have demonstrated that a high fat diet fed to normal female rats can elicit a hypertensive response and induce perivascular fibrosis before the development of overt obesity and in the absence of hyperlipidemia. Resveratrol therapy can prevent the hypertensive response in female rats fed a high fat diet but is without effect on the progression of perivascular fibrosis.

## INTRODUCTION

Obesity represents a growing health problem in industrialized countries contributing to the onset and/or development of various metabolic-associated disease states including dyslipidemia, and type 2 diabetes. Furthermore, in patients diagnosed with metabolic disorders, hypertension and coronary artery disease are prevalent and the subsequent risk of myocardial infarction is increased. (Grundy et al., 2006; Kenchaiah et al., 2002; Klein et al., *Circulation*, 2004). In the experimental setting, animals provided with a high fat diet and associated with overt obesity were likewise documented with elevated blood pressure (Dobrian et al., 2000, 2001; Erdei et al., 2006). The study by Dobrian et al (2000) demonstrated that the increase in systolic blood pressure in hypercholesterolemia obese rats that were fed a high fat diet may be related to the 2-fold increase of plasma renin. Furthermore, increased oxidative stress was also highlighted in obese patients and experimental animal models of obesity and delineated as a seminal event contributing to the development of hypertension (Dobrian et al., 2000; Erdei et al., 2006; Van Gaal et al., 2006; Roberts et al., 2001; Vachharajani and Vital, 2006; Yamato et al., 2007). The underlying mechanism attributed to the hypertensive action of oxidative stress is secondary to a reduction of biologically active NO via the interaction with superoxide anions (Dobrian et al., 2001; Erdei et al., 2006).

Despite the unequivocal relationship between obesity and cardiovascular disease, it remains presently unknown whether vascular reactivity is impaired and whether maladaptive remodeling of the heart occurs before an overt gain in body weight or a change in the plasma lipid profile. In this regard, the present study tested the hypothesis that an impairment of endothelial-mediated relaxation and a reactive fibrotic response in the heart are prevalent in normal adult female rats fed a high fat diet before the manifestation of overt obesity and in the absence of hyperlipidemia. Furthermore, as previously discussed, elevated oxidative stress represents a putative feature of obesity and is implicated in both vascular dysfunction and cardiac fibrosis (Dobrian et al., 2001; Erdei et al., 2006; Van Gaal et al., 2006; Lu et al., 2008). Thus, a second series of experiments tested the hypothesis that the coadministration of the natural antioxidant resveratrol (Baur et al., 2006; Das and Maulik, 2006) would counteract the deleterious effect of a high fat diet on endothelial-mediated relaxation and reactive fibrosis.

## METHODS

**Animals Care.** Female Sprague-Dawley strain rats (180-200 g; Charles River, St-Constant, Qc, Canada), were housed on arrival and had access to food and tap water ad libitum. The environment was controlled in terms of light (12:12-h light/dark cycle starting at 6:00 AM), humidity, and room temperature (20-23°C). All experiments were performed in compliance with recommendations of the Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals issued by the Canadian Council on Animal Research and the Guidelines of the Animal Care and approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute.

**Diet and Treatment Protocol.** One week after their arrival, rats were randomly assigned to either a standard or high fat diet for a period of 8 weeks. The high-fat diet consisted of 42% lipids, 36% carbohydrates, and 22% proteins (kcal) and was provided in small pellets (MP Biochemicals, Irvine, CA). The standard diet consisted of 12.5% lipids, 63.2% carbohydrates, and 24.3% proteins (kcal) (Agribands Purina Canada, Woodstock, ON). To assess the therapeutic benefit of resveratrol, 20 mg/kg/day resveratrol was added directly to rat chow, and this dose was reported to achieve a peak serum concentration of 1.2 $\mu$ M (Baur and Sinclair, 2006). Furthermore, an equivalent dose of resveratrol was recently shown to significantly prolong the health and survival of mice fed a caloric diet (Baur et al., 2006). During the 8-week protocol, the quantity of resveratrol added to the rat chow was adjusted according to changes in body weight measured once a week.

**Hemodynamic Measurements.** At the end of the study, rats were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg; Rogarsetic, Toronto, ON, Canada) and xylazine (10 mg/kg; Rompun, Cambridge, ON, Canada). Systolic and diastolic blood pressures were measured with a Millar catheter (2F; model SPR-407, Millar instrument, Houston, TX) following insertion through the right carotid. The Millar catheter was then inserted into the left ventricle to measure left ventricular (LV) contractility. Following baseline measurements, a cannula was inserted into the right jugular vein, and a submaximal dose of dobutamine was injected at a rate of 5  $\mu$ g/kg/min for a period of 3 min (Plante et al., 2005). Blood pressure and contractile indices were analyzed with the program IOX, version 1.8.9 (Emka Technologies; Falls Church, VA). Plasma lipid and glucose concentrations were determined by standard techniques in blood samples drawn from the carotid artery before

sacrifice and subsequently placed in tubes containing sodium citrate. The heart was removed subsequently, separated into the right ventricle, LV and septum, weighed, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

In a separate series of experiments, collagen content was determined by Sirius red, and staining was detected with a Polarizer-Trans U-P110 filter (Olympus, Carson Group Inc., Markham ON, Canada), as described previously (Mercier et al., 2002b). Ventricular function and cardiac morphology were not determined in these rats. In brief, the heart was excised, immersed in 10% formalin, and subsequently cut halfway between the base and apex. The apex and base sections of the heart were fixed, dehydrated, and embedded in paraffin. Serial cryostat sections ( $6\ \mu\text{m}$ ) of ventricular tissue were prepared. At least three distinct regions from the LV were assessed for collagen  $\alpha 1$  type 1 content (normalized to the surface area;  $\text{mm}^2$ ) and subsequently averaged. With regard to perivascular fibrosis, four vessels from each rat were assessed, and the lumen area was subtracted from the surface area. In parallel, vascular wall thickness was determined by measuring four distinct regions of the vessel and subsequently averaged. Following the quantification of collagen  $\alpha 1$  type 1, Sirius red staining was visualized with either a 10x/0.3 PLAN-NEOFLUOR or 63x-oil/1.4 DIC PLAN-APOCHROMAT objective mounted on a Zeiss LSM 510 confocal microscope, and the emitted signal was detected between 560 and 615 nm. Figure 1 represents a maximal projection derived from a z-stack of  $0.2\ \mu\text{m}$  slices. The z-stack was deconvolved with the Huygens Professional 3 software (SVI, Hilversum, The Netherlands), and the maximal projection was rendered with LSM 510 software (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany).

**Vascular Reactivity Studies.** After sacrifice, the aorta was harvested and placed in a modified Krebs bicarbonate solution (composition in  $\text{mmol L}^{-1}$ : NaCl 118.3, KCl 4.7,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25, ethylenediaminetetraacetate (EDTA) 0.026, dextrose 11.1, control solution). The aorta was subsequently dissected free of adherent fat and connective tissue and divided into rings ( $\approx 4\text{mm}$  in length). The aortic rings were suspended between 2 metal stirrups connected to an isometric force transducer in a chamber containing Krebs bicarbonate solution maintained at  $37^{\circ}\text{C}$ , and oxygenated with a mixture of 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ . After 30 minutes of stabilization, tension was progressively increased to the optimal tension of its active length-tension curve

(approximately 3.5 g), as determined by the contractile response to potassium chloride (KCl; 30 mM) at increasing levels of stretch. Maximal contraction was determined with KCl (60 mM), and aortic rings were excluded if the contractile response to potassium chloride was not observed (exclusion rate of less than 5%). After extensive washing, aortic rings were incubated in the presence of indomethacin ( $10^{-5}$  M) and propranolol ( $10^{-7}$  M). After a 45-min period of stabilization, phenylephrine ( $2 \times 10^{-9}$  to  $10^{-8}$  M) was added to achieve a contraction that was a 100% of the maximal contraction observed with to KCl (60 mM). Subsequent endothelial-dependent relaxation of isolated aortic rings was assessed with the addition of acetylcholine ( $10^{-10}$  to  $10^{-5}$  M), and the vascular response was expressed as a percentage of the maximal contraction to phenylephrine. In a separate series of experiments, resveratrol (0.1  $\mu$ M) was added to aortic rings isolated from both rats fed a high-fat and standard diet 10 minutes before the addition of acetylcholine. Lastly, endothelial-independent relaxation was assessed via the addition of sodium nitroprusside, and the vascular response expressed as a percentage of the maximal contraction to phenylephrine.

**Isolation of Total RNA, Reverse Transcriptase-PCR, and Real-Time PCR.** Total myocardial RNA was isolated by a modification of the guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction method, as described previously (Calderone et al., 1995). The reverse transcriptase reaction contained 5 ng/ $\mu$ L total RNA (each sample), Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase (800 U), RNaseOUT (40 U), random-hexamer primers (0.04 U), and dNTPs (0.5 mmol L<sup>-1</sup>) and supplied optimal buffers. The reaction protocol consisted of 3 successive incubation steps at 1) 25°C for 10 min, 2) 37°C for 50 min, and 3) 70°C for 15 min. Real-time PCR was performed on 2.5 ng of cDNA template containing the appropriate primers (300 nM) and SYBR Green PCR master mix. Primers for each gene were obtained from distinct exons that spanned an intron by using the Ensembl Genome Browser program (<http://www.ensembl.org>). The sequence specificity of each primer was verified with the Blast program derived from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The primers used are as follows: rat atrial natriuretic peptide (ANP), forward 5'AGAGCGGACTAGGCTGCAACA-3', and reverse 5'ATTTGGCTGTTATCTTCGGTA-3'; rat sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA2), forward 5'-TGTATCGACAGGACAGAAAGAGT-3', and reverse 5'-TGATGAGCGAGACAGATTCACCTG-3'; rat transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1),

forward 5'-CGTGCTAATGGTGGACCGCAACA-3', and reverse 5'-AGCTCTGCACGGGACAGCAAT-3'; rat transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3), forward 5'-AGAGATCCATAAATTCGACAT-3', and reverse 5'-ACACATTGAAACGGAAAACCT; rat connective tissue growth factor (CTGF), forward 5'-AGGCCCTGTGAAGCTGACCTAGA-3', and reverse 5'-TTTTAGGCGTCCGGATGCACT-3'; and rat  $\beta$ -actin, forward 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3', and reverse 5'-GAGGCATACAGGGACAACACAG-3'. Appropriate negative controls were used for each experiment.

**Drugs.** All drugs were prepared daily in Ultrapure distilled water, with the exception of indomethacin, and resveratrol were prepared in ethanol and dimethyl sulfoxide, respectively. Acetylcholine, bradykinin, indomethacin, and sodium nitroprusside were obtained from Sigma Chemical Co. (Mississauga, ON, Canada). Phenylephrine was obtained from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI), dobutamine from Sandoz Canada Inc. (Boucherville, QC, Canada), and propranolol from Biomol Research Laboratories Inc. (Plymouth Meeting, PA). For real-time PCR, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and RNase OUT were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada), random-hexamer primers from Amersham Biosciences (Baie d'Urfe, QC, Canada), dNTPs from MBI Fermentas (Burlington, ON, Canada) and SYBR Green PCR master mix was from Applied BioSystems (Foster, CA). Resveratrol was obtained from Royalmount Pharma (Montreal, QC, Canada).

**Statistical analysis.** All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. The half-maximum effective concentration (EC<sub>50</sub>) of acetylcholine-mediated relaxation of isolated aortic rings was measured from the individual dose-response curve using a logistic curve-fitting program (Allfit for Windows 2.12, Dr. DeLéan, Université de Montréal, QC, Canada). The *p*D2 value, the negative log of the EC<sub>50</sub>, was likewise obtained with the program Allfit. A one-way analysis of variance was performed to assess differences in collagen content, vessel lumen area, and wall thickness, and a significant difference was determined by the Bonferroni's post-hoc test and a *p* value less than 0.05 was considered statistically significant (StatView; SAS Institute Inc., Cary, NC). The effects of a high-fat diet and resveratrol treatment on body weight, cardiac morphology, left ventricular contractility, TGF- $\beta$ 3 mRNA, and acetylcholine-mediated relaxation (maximal response) of aortic rings

were analyzed by a two-way ANOVA (Statistica; StatSoft, Tulsa, OK), applied to determine whether there was an interaction between the two main effects. In the case of a significant interaction, a Tukey's (honest significant difference for equal or unequal  $n$ ) post-hoc test was used to compare diet (high-fat or standard) and treatment (with or without resveratrol) and a  $p$  value less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**Morphometric Data and the Plasma Lipid Profile.** A modest nonsignificant increase in body weight was observed in female rats fed a high-fat diet for a period of 8 weeks compared with female rats fed a standard diet (Table I). Despite a modest change in body weight, absolute heart weight and left ventricular weight were similar in rats fed a high-fat diet compared with rats fed a standard diet (Table I). In rats fed a high-fat diet, plasma cholesterol, high-density lipoprotein, and low-density lipoprotein concentrations were similar to rats fed a standard diet (Table II). Likewise, plasma glucose levels were comparable between both groups (standard diet,  $7.94 \pm 1.07$ ; high-fat diet,  $7.31 \pm 0.79$  mM). Lastly, in the high-fat fed rats, plasma triglyceride levels were modestly elevated compared with rats fed a standard diet but did not reach statistical significance (Table II).

**Mean Arterial Pressure and Left Ventricular Function.** In rats fed a high-fat diet, systolic and diastolic blood pressure, mean arterial pressure, and left ventricular systolic pressure were significantly ( $p < 0.05$ ) increased compared with rats fed a standard diet (Table III). Furthermore, left ventricular rate of contraction (+dP/dt) and relaxation (-dP/dt) were likewise increased but did not reach statistical significance (Table III). Lastly, to assess myocardial reserve, the contractile response to a dobutamine challenge was examined. In rats fed either a standard or high fat diet, the increase in contractile response to dobutamine was identical (Table IV).

**Cardiac Remodeling.** Despite an increase of mean arterial pressure, the steady-state mRNA levels of ANP and SERCA2 in the LV were comparable in rats fed a high-fat and standard diet (Table V). Employing the Sirius Red technique, collagen  $\alpha_1$  protein content in

the LV of rats fed a high-fat diet was not significantly increased compared with rats fed a standard diet (Table VI). By contrast, extensive and significant perivascular fibrosis was detected in rats fed a high-fat diet (Table VI; Fig. 1). Vessel lumen area (standard diet,  $0.0122\pm 0.0024$  mm<sup>2</sup>, versus high-fat,  $0.0201\pm 0.003$  mm<sup>2</sup>) and wall thickness (standard diet,  $0.0128\pm 0.0014$  mm; high-fat diet,  $0.0156\pm 0.002$  mm) were not significantly different between rats fed a standard or high-fat diet. The reactive fibrotic response in rats fed a high-fat diet was not associated with a change in the expression of putative profibrotic peptides as the steady-state mRNA levels of connective tissue growth factor and transforming growth factor- $\beta_1$  were identical to that observed in rats fed a standard diet (Table V). Moreover, transforming growth factor- $\beta_3$  mRNA levels were significantly decreased in the LV of rats fed a high fat compared with rats fed a standard diet (Table V).

**Vascular Reactivity and the in Vitro Effect of Resveratrol.** Endothelial-mediated relaxation may be compromised in hypertensive rats fed a high-fat diet. Indeed, the maximal relaxation of isolated aortic rings to acetylcholine was significantly decreased ( $p<0.05$ ) in rats fed a high-fat diet ( $22\pm 5\%$ ) compared with rats fed a standard diet ( $53\pm 8\%$ ) (Fig. 2). By contrast, vascular sensitivity ( $pD_2$ ) to acetylcholine was similar in rats fed a standard ( $7\pm 0.1$ ) and high-fat diet ( $6.9\pm 0.2$ ). The impaired response to acetylcholine in rats fed a high-fat diet was not related to an alteration in soluble guanylate cyclase responsiveness as the administration of the NO donor sodium nitroprusside promoted an identical dose-dependent relaxation of aortic rings from both groups (Fig. 3).

The impaired acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings isolated from rats fed a high-fat diet may be related to either a decrease of NO synthesis and/or a reduction of NO bioavailability secondary to an increase of vascular oxidative stress. In this regard, the antioxidant resveratrol ( $0.1$   $\mu$ M) reported to also stimulate NO synthase activity was added to aortic rings isolated from rats fed a high-fat diet, and acetylcholine-mediated relaxation was normalized ( $47\pm 9\%$ ) (Fig. 2). By contrast, the exogenous administration of resveratrol to aortic rings isolated from rats fed a standard diet had no effect on acetylcholine-mediated relaxation ( $53\pm 5\%$ ) (Fig. 2). Lastly, vascular sensitivity ( $pD_2$ ) to acetylcholine of resveratrol-treated aortic rings isolated from rats fed either a standard ( $7\pm 0.1$ ) or high-fat diet ( $7\pm 0.1$ ) was similar. Thus, the beneficial in vitro effect of resveratrol on acetylcholine-

mediated relaxation of aortic rings isolated from high-fat fed rats provided the impetus to examine whether the in vivo administration of the antioxidant could exert a therapeutic effect.

**Morphometric Data and Plasma Lipid Profile: The in Vivo Effect of Resveratrol.** The administration of resveratrol to rats fed either a standard or high fat diet were associated with a modest but nonsignificant decrease of overall body weight and body weight gain compared to the appropriate untreated group (Table I). The modest decline of body weight was attributed in part to the reduction of food intake in rats receiving resveratrol (Table I). Lastly, resveratrol administration did not alter either heart weight, LV weight, or the lipid profile in rats receiving either a standard or high-fat diet (Tables I and II).

**Blood Pressure Effect and Left Ventricular Function: The in Vivo Effect of Resveratrol.** The administration of resveratrol to rats fed a standard diet caused a modest nonsignificant decrease in blood pressure, left ventricular systolic pressure, and LV dP/dt indices compared with untreated rats fed a standard diet (Table III). By contrast, in rats fed a high-fat diet, the concomitant administration of resveratrol prevented the increase of systolic and diastolic blood pressure, mean arterial pressure, and left ventricular systolic pressure (Table III). Moreover, the administration of the antioxidant to rats fed a high-fat diet significantly decreased both LV dP/dt indices compared to untreated rats. Lastly, resveratrol administration did not influence the dobutamine response in rats fed either a standard or high-fat diet (Table IV).

**Cardiac Remodeling: The in Vivo Effect of Resveratrol.** Resveratrol did not alter either vessel lumen area (high-fat diet,  $0.0201 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ , versus high-fat diet + resveratrol,  $0.0155 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ ) or wall thickness (high-fat diet,  $0.0156 \pm 0.002 \text{ mm}$ , versus high-fat diet + resveratrol,  $0.0164 \pm 0.002 \text{ mm}$ ) in rats fed a high-fat diet. Furthermore, resveratrol administration to rats fed a high-fat diet failed to prevent the progression of perivascular fibrosis (Table VI). In the LV of rats fed a standard diet, resveratrol therapy did not influence TGF- $\beta$ 3 mRNA expression ( $3.14 \pm 0.29$ ;  $n=5$ ). However, the down-regulation of TGF- $\beta$ 3 mRNA ( $1.49 \pm 0.36$ ,  $n=8$ ) in rats fed a high-fat diet was prevented following the concomitant administration of resveratrol ( $3.49 \pm 0.31$ ;  $p < 0.05$  versus high-fat diet;  $n=5$  rats).

**Vascular Reactivity: The in Vivo Effect of Resveratrol.** The administration of resveratrol to rats receiving a standard diet enhanced acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings compared to untreated rats (Fig. 4). Moreover, resveratrol treatment of rats fed a high-fat diet significantly improved acetylcholine-mediated relaxation of isolated aortic rings, and the magnitude of relaxation was comparable to that observed in rats fed a standard diet (Fig. 4). The vascular sensitivity ( $pD_2$ ) to acetylcholine was unchanged in both resveratrol-treated rats groups (resveratrol + standard diet,  $7 \pm 0.02$ ; resveratrol + high-fat diet,  $7 \pm 0.12$ ) compared to their respective untreated groups.

## DISCUSSION

The relationship between obesity and cardiovascular disease has been unequivocally established clinically and in experimental models. Despite these observations, it remains presently unknown whether vascular reactivity is impaired and maladaptive cardiac remodeling occurs before an overt gain in body weight and in the absence of hyperlipidemia.

The present study has demonstrated that normal female rats provided with a high-fat diet for a period of 8 weeks were associated with a significant elevation of blood pressure and extensive perivascular fibrosis in the myocardium despite a nonsignificant increase in body weight and a normal plasma lipid profile and glucose concentration. Furthermore, the blood pressure increase in rats fed a high-fat diet was prevented by the coadministration of the antioxidant resveratrol. However, the therapeutic effect was limited to the vasculature as resveratrol treatment failed to attenuate the perivascular fibrotic response in the heart of rats fed a high-fat diet. An important paradigm established in the present study was that feeding normal female rats a high-fat diet for a period of 8 weeks caused a modest nonsignificant increase in body weight and plasma triglyceride levels without a change in the plasma lipid profile or glucose concentration. The administration of a comparable high-fat diet in a similar time frame to normal male rats led to a significant increase in body weight (Dobrian et al., 2000; Roberts et al., 2001; Erdei et al., 2006). Likewise, a similar sex-dependent relationship with regard to body weight gain was documented in various strains of mice fed a high-fat diet (Nishikawa et al., 2007). Thus, these data further support

the premise that the effect of a high-fat diet on body weight gain is temporally delayed in female rats compared to male rats.

Elevated blood pressure was reported in normal male rats fed a high-fat diet characterized by a marked increase in body weight gain and hyperlipidemia (Dobrian et al., 2000; Erdei et al., 2006). In the present study, normal female rats fed a high-fat diet were likewise associated with an increase in blood pressure and left ventricular systolic pressure. However, these changes occurred before a significant increase of body weight and in the absence of hyperlipidemia and hyperglycemia. Previous studies have demonstrated that elevated mean arterial pressure in obese rats was related to an impairment of endothelium-mediated relaxation of vascular tissue (Dobrian et al., 2001; Erdei et al., 2006; Galili et al., 2007). In the present study, acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings isolated from rats fed a high-fat diet was significantly compromised, whereas sodium nitroprusside-mediated relaxation was intact. Collectively, these data suggest that NO production was diminished and/or bioavailability was reduced secondary to the increased production of superoxide anions (Dobrian et al., 2001; Erdei et al., 2006; Roberts et al., 2006; Galili et al., 2007). In addition to its well established antioxidant property, resveratrol was also reported to increase NO synthesis (Wallerath et al., 2002; Wang et al., 2007). In the present study, the exogenous administration of resveratrol to aortic rings isolated from rats fed a high-fat diet normalized acetylcholine-mediated relaxation. Thus, these data strongly support the premise that impaired vascular relaxation in female rats fed a high-fat diet was related to an increased oxidative stress and/or decreased synthesis of NO and occurred in the absence of overt obesity, hyperlipidemia, or hyperglycemia.

It has been well established that elevated systemic arterial hypertension promotes a concentric pattern of cardiac hypertrophy characterized by the increased expression of ANP mRNA and concomitant down-regulation of SERCA2 mRNA (Grossman et al., 1975; Calderone et al., 1995). In the present study, despite an increase in blood pressure in rats fed a high-fat diet, neither ANP nor SERCA2 mRNA levels were altered in the LV. These data were consistent with the lack of change of either absolute LV weight or LV/body weight ratio in rats fed a high-fat diet compared with rats fed a standard diet. Thus, at least in female rats fed a high-fat diet for a period of 8 weeks, elevated blood pressure was not associated with a concomitant hypertrophic response. It is possible that the increase in

blood pressure was insufficient to promote hypertrophy or a more chronic exposure to a hypertensive state was required. By contrast, an extensive perivascular fibrotic response was observed in the heart of female rats fed a high-fat diet. Likewise, collagen  $\alpha 1$  protein content was modestly increased in the myocardium of female rats fed a high-fat diet but did not reach statistical significance. Collectively, these data were consistent with previous studies demonstrating the presence of a reactive fibrotic response in the myocardium of various experimental animal models of obesity (Zaman et al., 2004; Carroll and Tyagi, 2005). However, the present study has revealed that the reactive fibrotic response in the heart of female rats fed a high-fat diet represents an early maladaptive event independent of overt obesity, hyperlipidemia, and hyperglycemia. Furthermore, the induction of putative profibrotic peptides in the heart of obese animals was implicated in reactive fibrosis (Zaman et al., 2004; Carroll and Tyagi, 2005). Unexpectedly, a significant down-regulation of transforming growth factor- $\beta 3$  mRNA was observed in the LV of rats fed a high-fat diet. Presently, the underlying mechanism(s) attributed to the latter paradigm remains unknown. Moreover, neither connective tissue growth factor nor transforming growth factor- $\beta 1$  mRNAs were up-regulated in the myocardium of female rats fed a high-fat diet. Despite these findings, we cannot exclude the possibility that these peptide growth factors were selectively increased in the vasculature, thereby directly contributing to the perivascular fibrotic response (Zaman et al., 2004; Ruiz-Ortega et al., 2007). Lastly, the suppression or attenuation of antifibrotic events may likewise contribute to cardiac fibrosis. Indeed, a dysfunction of NO signaling is sufficient to promote both reactive fibrosis and the up-regulation of putative profibrotic peptides in the heart (Goto et al., 1999; Ruetten et al., 2005), and the present study has demonstrated that either a decrease in NO synthesis or bioavailability was reduced in the aorta of female rats fed a high-fat diet.

The efficacy of exogenous resveratrol to normalize acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings isolated from rats fed a high-fat diet provided the impetus to assess whether the *in vivo* administration would likewise attenuate the rise in blood pressure. Indeed, resveratrol administration to rats fed a high-fat diet prevented the hypertensive response. Furthermore, the beneficial *in vivo* hemodynamic effect of resveratrol was associated with the preservation of acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings isolated from rats fed a high-fat diet. Thus, these data support the premise that resveratrol represents an appropriate pharmacological approach to prevent vascular dysfunction in female rats fed a high-fat diet.

The scavenging of superoxide anions, increasing NO synthesis, and the phytoestrogenic property of resveratrol represent underlying mechanisms that may have synergistically prevented the rise of mean arterial pressure in rats fed a high-fat diet (Gehm et al., 1997; Wallerath et al., 2002; Baur and Sinclair, 2006; Wang et al., 2007).

The relationship between hypertension and cardiac fibrosis has been well established (Berk et al., 2007). Moreover, increased oxidative stress represents a putative feature of obesity and was further shown to participate in the progression of cardiac fibrosis either directly or indirectly via the suppression of NO synthesis (Dobrian et al., 2000; Ruetten et al., 2005; Erdei et al., 2006; Lu et al., 2008). In this regard, an attenuation of the perivascular fibrotic response would be expected in the heart of resveratrol-treated rats fed a high-fat diet based on the beneficial effect on blood pressure and its established antioxidant property. Furthermore, a direct antifibrotic action was identified in vitro as resveratrol suppressed cardiac fibroblast proliferation (Olson et al., 2005; Wang et al., 2007). Despite these observations, the in vivo administration of resveratrol failed to prevent the progression of perivascular fibrosis in the heart of rats fed a high-fat diet. Nonetheless, cardiac remodeling was sensitive to resveratrol therapy as the decreased expression of transforming growth factor- $\beta$ 3 mRNA in the heart of rats fed a high-fat diet was prevented. The latter beneficial effect may be related in part to the phytoestrogenic property of resveratrol as  $17\beta$ -estradiol treatment of either cardiac fibroblasts or osteoclasts increased transforming growth factor- $\beta$ 3 mRNA expression (Yang et al., 1996; Mercier et al., 2002a). Thus, in female rats fed a high-fat diet, the perivascular fibrotic response was at least independent of a rise in blood pressure. Furthermore the normalization of acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings isolated from resveratrol-treated female rats fed a high-fat diet indirectly suggests that the increased perivascular fibrotic response in these hearts may not be secondary to a decreased bioavailability or synthesis of NO.

In conclusion, the present study has demonstrated that, prior to the development of overt obesity and in the absence of hyperlipidemia and hyperglycemia, female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and perivascular fibrosis. Resveratrol administration preserved vascular function, whereas the perivascular fibrotic response in the heart of female rats fed a high-fat diet persisted. Thus, these data

demonstrate that disparate events are linked to the development of hypertension and perivascular fibrosis in female rats fed a high-fat diet.

**Acknowledgement** We thank Marie-Pierre Mathieu and Louis Villeneuve for technical assistance and Antoinette Paolitto for excellent secretarial assistance.

## REFERENCES

- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, et al. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **444**:337-42.
- Baur JA and Sinclair DA (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* **5**:493-506.
- Berk BC, Fujiwara K, and Lehoux S (2007) ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* **117**:568-75.
- Calderone, A., Takahashi, N., Izzo, N.J., Thaik, C.M., and Colucci, W.S (1995) Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation* **92**:2385-90.
- Carrol JF and Tyagi SC (2005) Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rat. *Am J Hypertens* **18**:692-8.
- Das DK and Maulik N (2006) Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol Interv* **6**:36-47.
- Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, and Lauterio TJ (2000) Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* **35**:1009-15.
- Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, and Prewitt RL (2001) Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* **37**:554-60.
- Erdei N, Toth A, Pasztor ET, Papp Z, Edes I, Koller A, and Bagi Z (2006) High fat diet-induced reduction in nitric-oxide dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**:H2107-H2115.
- Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Mannheim D, McConnel JP, Chade AR, Lerman LO, and Lerman A (2006) Early experimental obesity is associated with coronary

- endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**:H904-H911.
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, and Jameson JL (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:14138-43.
- Goto D, Fujii S, Tarikuz Zaman AKM, Sakuma I, Gao M, Koyama T, Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Sobel BE, and Kitabatake A (1999) Long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats modulates coronary network remodeling. *Angiogenesis* **3**:137-46.
- Grossman W, Jones D, and McLaurin LP (1975) Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* **56**:56-64.
- Grundey SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, et al. (2006). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Curr Opin Cardiol* **21**:1-6.
- Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, and Vasan RS (2002) Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* **347**:305-13.
- Klein S, Burke LE, Bray GA, Blair S, Allison DB, Pi-Sunyer X, Hong Y, and Eckel RH (2004) Clinical implications of obesity with specific focus on cardiovascular disease: a statement for professionals from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism: endorsed by the American College of Cardiology Foundation. *Circulation* **110**:2952-67.
- Lu Z, Xu X, Hu X, Zhu G, Zhang P, van Deel ED, French JP, Fassett JT, Tim D, Oury TD, et al. (2008) Extracellular superoxide dismutase deficiency exacerbates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction. *Hypertension* **51**:19-25.
- Mercier I, Mader S, and Calderone A (2002a) Ovarian hormones induce TGF- $\beta$  and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on the cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovasc Res* **53**:728-39.
- Mercier I, Pham-Dang M, Clement R, Colombo F, Gosselin H, and Calderone A (2002b) Elevated mean arterial pressure in the ovariectomized rat was normalized by ET<sub>A</sub> receptor antagonist therapy: Absence of cardiac hypertrophy and fibrosis. *Br J Pharmacol* **136**:685-92.

- Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H, and Uetsuka K (2007) Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim* **65**:263-72.
- Olson ER, Naugle JE, Zhang X, Bomser JA, and Meszaros JG (2005) Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**:H1131-H1138.
- Plante E, Lachance D, Drolet MC, Roussel E, Couet J, and Arsenault M (2005) Dobutamine stress echocardiography in healthy adult male rats. *Cardiovasc Ultrasound* **3**:34-40.
- Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, and Vaziri ND (2006) Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* **55**:928-34.
- Roberts CK, Vaziri ND, and Barnard RJ (2001) Protective effects of estrogen on gender-specific development of diet-induced hypertension. *J Appl Physiol* **91**:2005-9.
- Ruetten H, Dimmeler S, Gehring D, Ihling C, and Zeiher AM (2005) Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload. *Cardiovasc Res* **66**:444-53.
- Ruiz-Ortega M, Roriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, and Egidio J (2007) TGF- $\beta$  signaling in vascular fibrosis. *Cardiovas Res* **74**:196-206.
- Vachharajani V and Vital S (2006) Obesity and sepsis. *J Intensive Care Med* **21**:287-95.
- Van Gaal LF, Mertens IL, and deBlock CE (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* **444**:875-80.
- Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, and Förstermann U (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide stnthase. *Circulation* **106**:1652-8.
- Wang S, Wang X, Yan J, Xie X, Fan F, Zhou X, Han L, and Chen J (2007) Resveratrol inhibits proliferation of cultured rat cardiac fibroblasts: Correlated with NO-cGMP signaling pathway. *Eur J Pharmacol* **567**:26-35.
- Yamato M, Shiba T, Yoshida M, Ide T, Seri N, Kudou W, Kinugawa S, and Tsutsui H (2007) Fatty acids increase the circulating levels of oxidative stress factors in mice with diet-induced obesity via redox changes of albumin. *FEBS J* **274**:3855-63.
- Yang NN, Bryant HU, Hardikar S, Sato M, Galvin RJ, Glasebrook AL, and Termine JD (1996) Estrogen and raloxifen stimulate transforming growth factor- $\beta$  3 gene

expression in rat bone: a potential mechanism for estrogen- or raloxifen-mediated bone maintenance. *Endocrinology* **137**:2075-84.

Zaman AK, Fujii S, Goto D, Furumoto T, Mishima T, Nakai Y, Donc J, Imagawa S, Sobel BE, and Kitabatake A (2004) Salutory effects of attenuation of angiotensin II on coronary perivascular fibrosis associated with insulin resistance and obesity. *J Mol Cell Cardiol* **37**:525-35.

## LEGENDS

**Figure 1.** Sirius red staining. A1 and A2, modest level of collagen  $\alpha 1$  type 1 protein was detected surrounding blood vessels in rats fed a standard diet. B1 and B2, by contrast, the perivascular deposition of collagen was markedly higher in rats fed a high-fat diet. C1 and C2, furthermore, the administration to resveratrol to rats fed a high-fat diet did not prevent the perivascular fibrotic response. A1, B1, and C1 were taken at 10X; A2, B2, and C2 were taken at 63X. Vessel lumen area and wall thickness were not statistically different among the groups (see *Results*).

**Figure 2.** Acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings and the *in vitro* effect of resveratrol administration. In rats fed a high-fat diet ( $\square$ ), acetylcholine-mediated relaxation was significantly reduced compared with female rats fed a standard diet ( $\diamond$ ). The exogenous administration of resveratrol (0.1  $\mu$ M) to aortic rings isolated from rats fed a standard diet ( $\blacklozenge$ ) did not influence acetylcholine-mediated relaxation. By contrast, acetylcholine-mediated relaxation was normalized following the exogenous administration of resveratrol to aortic rings isolated from rats fed a high-fat diet ( $\blacksquare$ ). Acetylcholine-mediated relaxation is expressed as a percentage of the maximal contraction to phenylephrine. Results are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \*,  $p < 0.05$  versus all groups as determined by a two-way ANOVA.

**Figure 3.** Sodium nitroprusside-mediated relaxation of aortic rings. Sodium nitroprusside-mediated relaxation of aortic rings isolated from female rats fed either a standard ( $\diamond$ ) or high-fat diet ( $\square$ ) was equivalent. Sodium nitroprusside-mediated relaxation is expressed as a percentage of the maximal contraction to phenylephrine. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M.

**Figure 4.** Acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings and the *in vivo* effect of resveratrol administration. In rats fed a high-fat diet ( $\square$ ), acetylcholine-mediated relaxation was significantly reduced compared with female rats fed a standard diet ( $\diamond$ ). The *in vivo* administration of resveratrol for a period of 8 weeks significantly enhanced acetylcholine-mediated relaxation of aortic rings isolated from rats fed a standard diet ( $\blacklozenge$ ). Moreover, acetylcholine-mediated relaxation remained intact in resveratrol-treated rats fed a high-fat

diet (■). Acetylcholine-mediated relaxation is expressed as a percentage of the maximal contraction to phenylephrine. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \*,  $p < 0.05$  versus standard diet; \*\*,  $p < 0.05$  versus respective resveratrol-treated group as determined by a two-way ANOVA.

FIGURES

Figure 1

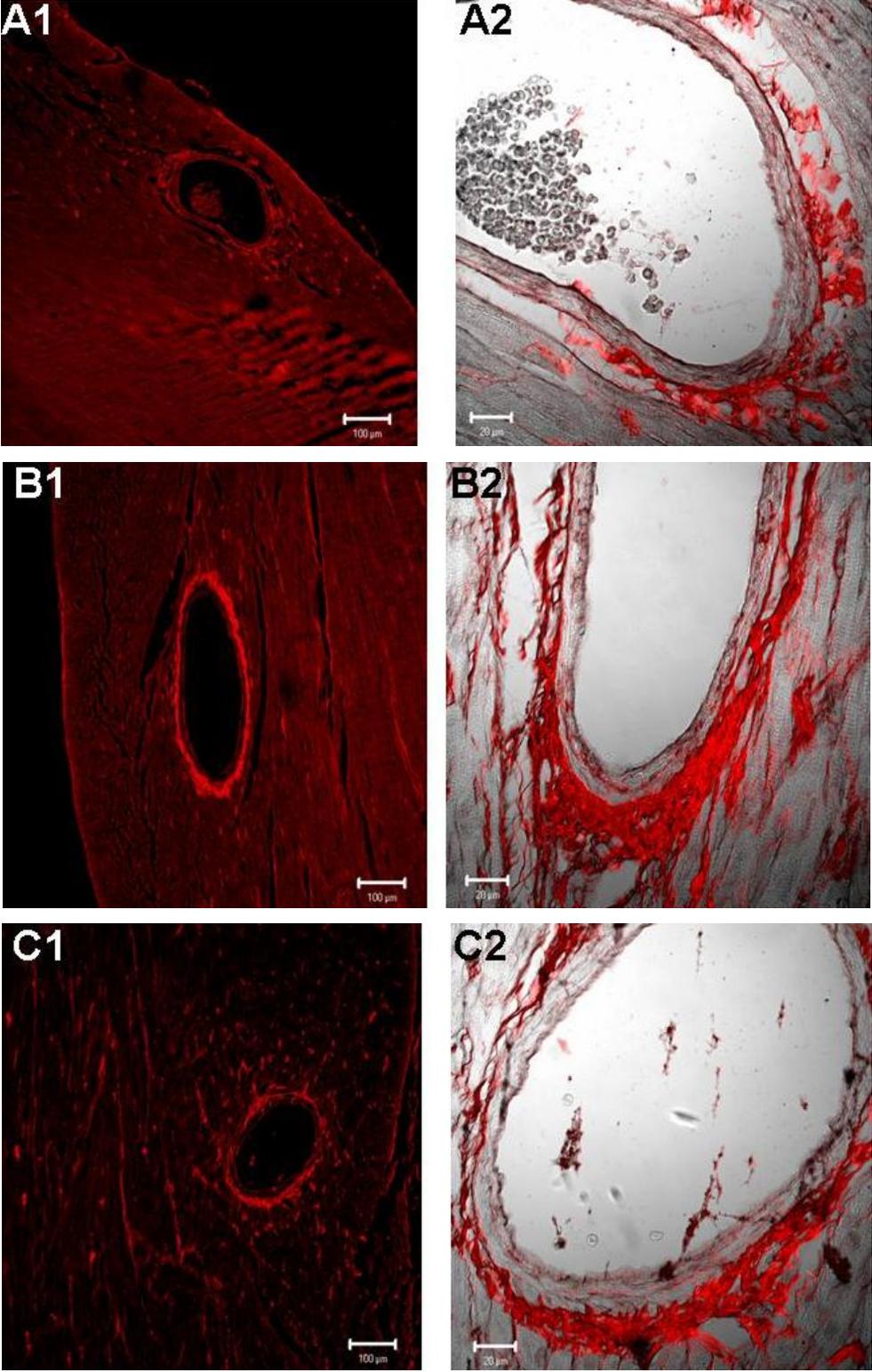


Figure 2

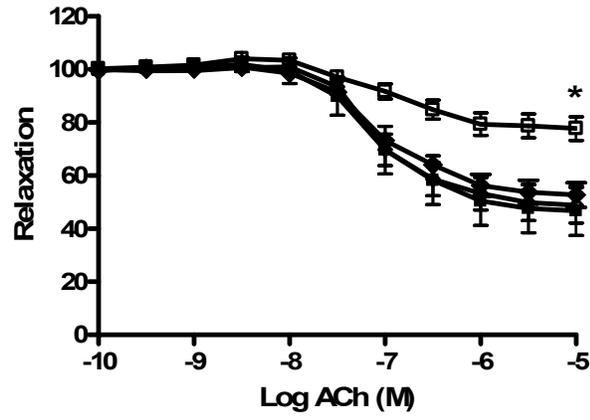


Figure 3

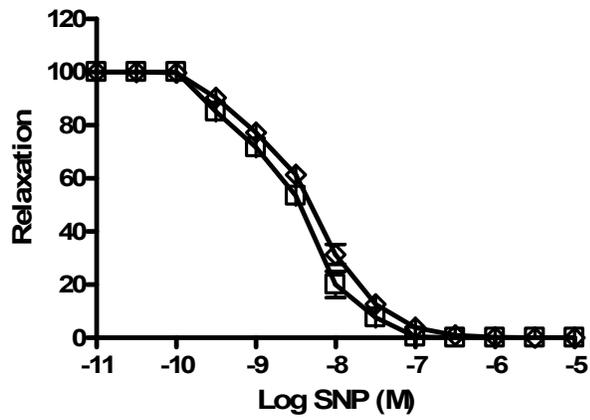
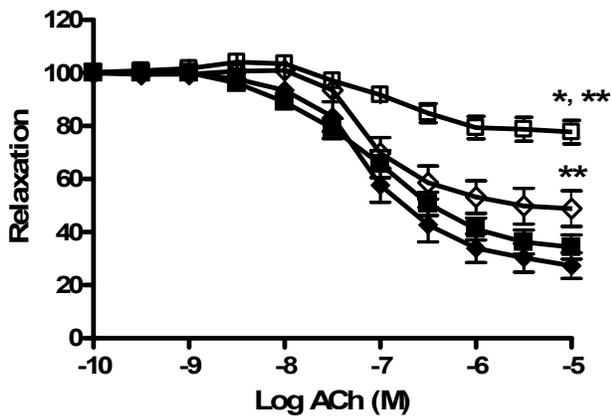


Figure 4



## TABLES

**Table I.** Body and heart weight in female rats fed a standard or high fat diet and the effect of resveratrol (RES).

	Standard (n= 9)	High-Fat (n= 10)	Standard+RES (n= 10)	High-Fat+RES (n= 10)
Initial body weight (g)	222 ± 4	228 ± 3	227 ± 3	227 ± 2
Final body weight (g)	300 ± 10	330 ± 14	289 ± 3	301 ± 7
Weight gain (g)	78 ± 8	102 ± 17	62 ± 4	75 ± 6
Food intake (g/day)	17.8 ± 0.2	17.7 ± 0.2	17.0 ± 0.3*	16.5 ± 0.2
LV weight (g)	0.41 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.40 ± 0.01
Heart weight (g)	0.88 ± 0.02	0.93 ± 0.04	0.90 ± 0.02	0.91 ± 0.02
Ratio LV/body weight	1.36 ± 0.04	1.34 ± 0.05	1.42 ± 0.05	1.33 ± 0.04
Ratio heart/body weight	2.90 ± 0.10	2.81 ± 0.06	3.14 ± 0.04	3.04 ± 0.09

Data are presented as mean ± S.E.M. (n=number of rats per group).\*  $p < 0.05$  versus standard diet as determined by a two-way ANOVA.

**Table II.** The plasma lipid profile in female rats fed a standard or high-fat diet and the effect of resveratrol (RES).

	Standard (n= 9)	High-Fat (n= 10)	Standard+RES (n= 10)	High-Fat+RES (n= 10)
Total cholesterol (mM)	2.15 ± 0.14	2.33 ± 0.19	1.84 ± 0.09	2.23 ± 0.17
HDL (mM)	0.75 ± 0.04	0.72 ± 0.05	0.66 ± 0.02	0.74 ± 0.08
LDL (mM)	0.64 ± 0.16	0.54 ± 0.24	0.64 ± 0.13	0.61 ± 0.33
Triglycerides (mM)	1.69 ± 0.24	2.42 ± 0.44	1.11 ± 0.22	1.80 ± 0.46

Data are presented as mean ± S.E.M. (n=number of rats per group).HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein.

**Table III.** Mean arterial pressure and left ventricular contractility in female rats fed a standard or high-fat diet and the effect of resveratrol (RES).

	Standard ( <i>n</i> = 9)	High-Fat ( <i>n</i> = 10)	Standard+RES ( <i>n</i> = 10)	High-Fat+RES ( <i>n</i> = 10)
Heart rate (beat/min)	254 ± 5	242 ± 6.4	244 ± 12	244 ± 9
Systolic pressure (mmHg)	134 ± 8	171 ± 7*	115 ± 7	107 ± 6**
Diastolic pressure (mmHg)	96 ± 5	109 ± 3*	89 ± 5	81 ± 5**
MAP (mmHg)	108 ± 6	130 ± 4*	97 ± 6	90 ± 5**
LV systolic pressure (mmHg)	123 ± 6	148 ± 9*	106 ± 5	106 ± 4
LVEDP (mmHg)	9.1 ± 1.0	10.9 ± 1.4	6.3 ± 0.7	7.3 ± 0.6
LV + dP/dt (mmHg·s <sup>-1</sup> )	6068 ± 289	6973 ± 282	5297 ± 520	5564 ± 249**
LV - dP/dt (mmHg·s <sup>-1</sup> )	-5189 ± 312	-6012 ± 333	-4257 ± 503	-4336 ± 263**

Data are presented as mean ± S.E.M. (*n*=number of rats per group).MAP, mean arterial pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure. \* *p*<0.05 versus standard diet. \*\**p*<0.05 versus high fat diet as determined by a two-way ANOVA.

**Table IV.** Cardiac response to dobutamine infusion (5 µg/kg/min) in female rats fed a standard or high-fat diet and the effect of resveratrol (RES).

	Dobutamine Response (% Change versus Baseline)			
	Standard ( <i>n</i> = 7)	High-Fat ( <i>n</i> = 6)	Standard+RES ( <i>n</i> = 6)	High-Fat+RES ( <i>n</i> = 8)
Heart rate (beat/min)	24 ± 4	35 ± 3	31 ± 6	31 ± 5
Systolic pressure (mmHg)	32 ± 5	29 ± 8	31 ± 6	34 ± 6
+dP/dt (mmHg/sec)	43 ± 2	47 ± 4	47 ± 3	50 ± 4
-dP/dt (mmHg/sec)	42 ± 6	44 ± 6	45 ± 8	49 ± 7

Data are presented as mean ± S.E.M. (*n*<number of rats per group).

**Table V.** mRNA expression in the left ventricle of female rats fed a standard or high-fat diet.

	Standard	High-Fat
ANP (n=8)	10.60 ± 1.97	11.65 ± 2.10
SERCA-2 (n=8)	1.67 ± 0.21	1.43 ± 0.12
TGF β1 (n=4)	0.36 ± 0.07	0.31 ± 0.03
TGF β3 (n=8)	3.38 ± 0.50	1.49 ± 0.36*
CTGF (n=4)	7.57 ± 0.98	6.32 ± 1.05

Data are presented as mean ± S.E.M. (*n*=number of rats per group) and normalized to β-actin mRNA. CTGF, connective tissue growth factor. \* *p*<0.05 versus standard diet.

**Table VI.** Left ventricular and perivascular collagen α1 type 1 content in rats fed a standard or high-fat diet and the effect of resveratrol (RES).

	Standard	High-Fat	High-Fat+RES
Left ventricle (n=4)	0.0057 ± 0.002	0.0092 ± 0.002	0.0129 ± 0.0010
Perivascular (n=4)	0.1141 ± 0.0300	0.2670 ± 0.0200*	0.3240 ± 0.0200*

Data are presented as mean ± S.E.M. (*n*=number of animals per group) and normalized to surface area (mm<sup>2</sup>). \* *p*<0.05 versus standard diet as determined by a one-way ANOVA.

## CHAPITRE SEPTIÈME : DEUXIÈME ÉTUDE

---

### **Female Rats Fed a High Fat Diet Were Associated with an Increased Risk of Ventricular Arrhythmia in the Absence of Overt Obesity and Hyperlipidemia**

Marie-Claude Aubin, Sophie Cardin, Philippe Comtois, Robert Clément, Hugues Gosselin, Marc-Antoine Gillis, Khai LeQuang, Stanley Nattel, Louis P. Perrault and Angelino Calderone,

Department of Physiology, (A.C., P.C.); Department of Pharmacology (M.-C.A., K.L., L.P.P., A.C.); Department of Surgery (L.P.P.), Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. Department of Pharmacology, McGill University, Montreal, Quebec (S.C., S.N) and the Research Center of the Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada (M.-C.A., S.C., P.C., R.C., H.G., M-A.G, K.L., S.N., L.P.P., A.C.).

Running title; High fat diet and cardiac arrhythmias

Statut: En préparation pour soumission dans *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.

## Déclaration des co-auteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Marie-Claude Aubin inclue l'article identifié ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Étude de la fonction vasculaire et du remodelage cardiaque avant l'établissement de l'obésité et de la dyslipidémie chez les rats femelles recevant une diète riche en gras.

Sophie Cardin

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Philippe Comtois

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Marc-Antoine Gillis

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Robert Clément

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Hugues Gosselin

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Khai LeQuang

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Stanley Nattel

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Louis P. Perrault

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Angelino Calderone

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

## ABSTRACT

Obesity is associated with an increased incidence of cardiac arrhythmias and maladaptive scar healing. However, prior to the onset of overt obesity and in the absence of hyperlipidemia, it remains presently unknown if the heart exhibits an arrhythmogenic phenotype and/or scar healing is compromised after an ischemic insult. To directly examine these issues, a high fat diet was fed to adult female rats. After 8 weeks of feeding, a non-significant increase in body weight was observed and associated with a normal plasma lipid profile. Following ischemia/reperfusion injury, scar length (sham,  $0.29 \pm 0.09$  versus high fat,  $0.32 \pm 0.13$  cm), thickness (sham,  $0.047 \pm 0.02$  versus high fat,  $0.059 \pm 0.01$  cm) and collagen  $\alpha_1$  type 1 content (sham,  $0.21 \pm 0.04$  versus high fat,  $0.20 \pm 0.04$  arbitrary units/ $\text{mm}^2$ ) in the infarcted heart of rats fed a high fat diet were similar to infarcted normal rats. *In vivo* studies demonstrated that incidence of inducible ventricular extrasystoles were significantly ( $p < 0.05$ ) greater in rats fed a high fat diet. These hearts were sympathetically hyperinnervated, as reflected by the increased density of neurofilament-M immunoreactive fibres (standard,  $2020 \pm 260$  versus high fat,  $2830 \pm 250$   $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ;  $p < 0.05$  versus standard). Moreover, connexin-40 expression was absent and connexin-43 lateralization was observed in ventricular myocytes of rats fed a high fat diet. Thus, in the absence of overt obesity, the heart of female rats fed a high fat diet was sympathetically hyperinnervated and associated with aberrant pattern of gap junctional protein expression and distribution. These pathophysiological events may have contributed in part to the higher incidence of cardiac arrhythmias.

## INTRODUCTION

Obesity is a well established risk factor for myocardial infarction in both men and women (Poirier et al., 2006). Moreover, ischemia/reperfusion injury to the heart of either rats or mice characterized with overt obesity led to scar expansion and impaired healing, as reflected by a decreased deposition of collagen (du Toit et al., 2008; Thakker et al., 2006). Thus, in addition to an increased risk of myocardial infarction, obesity predisposes the ischemically damaged heart to an inadequate reparative fibrotic response. Biologically, impaired scar healing was identified as an underlying event leading to left ventricular dilatation and subsequent adverse cardiac remodeling (Thakker et al., 2006; Dai et al., 2005). Furthermore, post-infarction obese patients were associated with a greater risk of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death (Poirier et al., 2006; Pietrasik et al., 2007). However, prevalence for cardiac arrhythmias and increased risk of sudden death was also reported in obese patients characterized with normal contractile function (Poirier et al., 2006). Potential arrhythmogenic mechanisms linked to obesity include a prolonged QT<sub>c</sub> interval and increased sympathetic activity (Poirier et al., 2006; Stocker et al., 2007; Alvarez et al., 2002).

In spite of the unequivocal relationship between obesity and cardiovascular disease, it remains presently unknown whether inadequate scar healing following an ischemic insult to the heart and/or increased risk to cardiac arrhythmias are prevalent prior to the establishment of overt obesity and hyperlipidemia. Previous work from our lab has demonstrated that feeding a high fat diet to normal female rats for a period of 8 weeks led to an increase in mean arterial pressure despite a modest non-significant increase in body weight and a normal plasma lipid profile and glucose levels (Aubin et al., 2008). Based on these findings, this model represents a suitable experimental approach to examine the influence of a high fat diet on scar healing and arrhythmogenesis in the absence of obesity, hyperlipidemia and hyperglycaemia. Therefore, the following study will test the hypothesis that the heart of female rats fed a high fat diet for 8 weeks was associated with an arrhythmogenic phenotype and/or an impaired reparative fibrotic response following an ischemic insult.

## METHODS

**High fat diet.** Female Sprague-Dawley strain rats (180-200 grams; Charles River, St-Constant, QC, Canada), were housed on arrival and had access to food and tap water *ad libitum*. The environment was controlled in terms of light (12:12-h light-dark cycle starting at 6:00 AM), humidity, and room temperature (20-23°C). One week after their arrival, rats were randomly assigned to either a standard or high fat diet for a period of 8-weeks. The high fat diet consisted of 42% lipids, 36% carbohydrates, and 22% proteins (kcal) and was provided in small pellets (ICN Pharmaceuticals, New York, NY). The standard rat diet consisted of 12.5% lipids, 63.2% carbohydrates, and 24.3% proteins (kcal) (Agribrands Purina Canada, Woodstock, ON). Aortic reactivity to acetylcholine was determined in a subpopulation of rats in each group. As previously demonstrated (Aubin et al., 2008), the vasorelaxant action of acetylcholine on aortic rings isolated from rats fed a high fat diet was significantly reduced (data not shown). Additional female rats fed a standard ( $295 \pm 10$  grams;  $n=7$ ) or high fat ( $331 \pm 17$  grams;  $n=7$ ) diet were used exclusively for immunofluorescence experiments and their contractile status is depicted in the Supplemental Table. All experiments were performed in compliance with recommendations of the guidelines on the care and use of laboratory animals issued by the Canadian Council on Animal Research and the protocol was approved by the Animal Care Committee of the Montreal Heart Institute.

**Ischemic rat models.** Following 8 weeks of feeding either a standard or high fat diet, a subpopulation of rats from either group were arbitrarily selected and subjected to either a sham operation or an ischemic insult (e.g. complete coronary artery ligation or ischemic reperfusion injury). Briefly, rats were sedated with a mixture of ketamine ( $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; Rogarsetic, Toronto, ON, Canada) and xylazine ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; Rompun, Cambridge, ON, Canada) and the left anterior descending coronary artery was occluded permanently or for a duration of 45 minutes then removed. In the permanent coronary artery occlusion model, neither heart weight nor contractile function was determined. During the occlusion period of rats subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury, surface ECG (conventional DII position) measurements were recorded. An arrhythmic event was defined by the appearance of 5-8 successive ventricular extrasystoles. One week later, hemodynamic measurements

were made with a Millar catheter (2F; model SPR-407; Millar Instrument, Houston, TX), as previously described (Aubin et al., 2008). The plasma lipid profile was determined in blood samples taken from the carotid artery before sacrifice, as previously described (Aubin et al., 2008). Thereafter, the heart was removed and used for protein and mRNA expression, immunofluorescence, or planimetry. Table I depicts the number of rats in each group for which both body and ventricular weights were obtained. Table II includes the hemodynamic status of rats from table I and additional rats from the standard or high fat diet group subjected to ischemia/reperfusion injury. Ventricular weights were not obtained from these additional rats because the heart was used for to assess scar collagen content by Sirius Red staining and infarct remodeling by planimetry.

**In vivo Electrophysiologic Measurements.** High fat diet (n=12) and standard diet (n=10) rats were anesthetized under 3% isoflurane, intubated and ventilated. An octopolar catheter 1.9F with 0.5mm of electrode spacing (Scisense) was inserted through the carotid artery into the left ventricle for simultaneous stimulation and recording. Stimulations were performed with a computer-based stimulator triggering a voltage stimulus isolator (Grass Telefactor model SD9K). The stimulator is built using homemade C++ library and Matlab interfaces running in a windows environment. Up to 8 stimulus isolators could be controlled with a maximum timing error of 1 microsecond. Surface ECG (lead I), intracardiac electrogram and stimulation impulse trace were recorded to a computer through IOX software (version 1.8.11.12, EMKA technologies) for monitoring and off-line analysis. Electrograms were filtered between 1 and 500 Hz. The threshold voltage was defined as the minimum voltage to capture approximately 90% of the beats with a train of 2-ms rectangular pulses. Ventricular effective refractory period (VERP) were measured at two times threshold, with a 10-stimuli drive train (S1), at different basic cycle length (200 ms and 100 ms), followed by a premature stimulus (S2) progressively decremented in 2-ms intervals. VERP was defined as the longest S1-S2 interval that failed to generate a response beat to the S2 stimulus. VERP was also measured with two and three premature stimuli (S2-S3 and S2-S3-S4) following the S1 train. S1-S2 (or S1-S2 and S2-S3) intervals were set at VERP + 10 ms and S2-S3 (or S3-S4) was decremented progressively by 2-ms steps. Spontaneous extrasystoles and tachycardia (more than 10 consecutive extrasystoles) frequency and duration were recorded and averaged over the whole experimental protocol. Ventricular tachycardia was also temptatively induced by rapid train of stimulation (burst

spacing, 20 stimuli) at different cycle length, starting at 100ms and decreasing by 5-ms steps down to 30ms. Train were repeated twice for each cycle length. Rapid rhythm (>500 beats/min) consisting of >10 extrasystoles with varying electrocardiogram morphology and activation times were considered as ventricular tachycardia.

**Planimetry and collagen content.** The heart was excised, immersed in 10% formalin and subsequently cut halfway between the base and apex. The apex and base sections of the heart were fixed, dehydrated and embedded in paraffin. Serial cryostat sections (6  $\mu\text{m}$ ) of ventricular tissue were prepared. Sirius Red staining was used to measure collagen  $\alpha_1$  type 1 content (arbitrary units normalized to the surface area;  $\text{mm}^2$ ) in the left ventricle and infarct region and Hematoxylin-Phloxine-Safran staining employed to assess scar remodeling, as previously described (Aubin et al., 2008; Gosselin et al., 1998).

**Real-Time PCR.** Real time PCR was performed by standard methodology on total RNA isolated from the left ventricle as previously described (El-Helou et al., 2005). In all experiments, the left ventricle was divided in two and a sample used for real time PCR and Western blot analysis (please see below). Real time PCR was performed according to the manufacturer's instructions employing the molecule SYBR Green (Applied BioSystems). Primers for each gene were obtained from distinct exons that span an intron employing the program Ensembl Genome Browser ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). The sequence specificity of each primer was verified with the program Blast derived from the National Centre for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). The primers used are as follows: rat atrial natriuretic peptide (ANP): Forward 5'-AGAGCGGACTAGGCTGCAACA-3', Reverse 5'-ATTGGCTGTTATCTTCGGTA-3', rat nerve growth factor- $\beta$  (NGF- $\beta$ ): Forward 5'-CAGCTTTCTATCCTGGCCACTC-3', and rat  $\beta$ -actin: Forward 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAA-3', Reverse 5'-GAGGCATACAGGGACAACACAG-3'. Appropriate negative controls were used for each experiment. mRNA levels were normalized to  $\beta$ -actin mRNA.

**Immunofluorescence.** The heart was excised, immersed directly in 2-methyl butane (temperature maintained at  $-80^\circ\text{C}$ ), and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Immunofluorescence on cardiac tissue (cryostat sections of 14  $\mu\text{m}$  thickness) was performed as previously described (El-

Helou et al., 2005). Antibodies employed include the rabbit polyclonal anti-connexin 40 (1:100; Chemicon); mouse monoclonal anti-connexin 43 (1:500; Chemicon), and the rabbit polyclonal anti-neurofilament-M (1:500; Chemicon). Secondary antibodies used were a goat anti-mouse IgG conjugated to conjugated to Alexa-546 (1:500; InVitrogen; emission wavelength, 570 nm) and a goat anti-rabbit IgG conjugated to Alexa-488 (1:500; InVitrogen; emission wavelength, 520 nm). Non-specific staining was determined following the addition of an isotype control antibody or the conjugated secondary antibody alone. The nucleus was identified with to-pro<sup>3</sup> (InVitrogen; 1.5  $\mu$ M; emission wavelength, 661 nm) staining. Immunofluorescence was visualized with a 10X- or 63X-oil 1.4 NA DIC plan apochromat objective mounted on a Zeiss Axiovert 100 M confocal microscope. To determine sympathetic fibre density, a transverse section from the heart of each rat was used and the density ( $\mu\text{m}^2$ ) of neurofilament-M immunoreactive fibres in the left ventricle was determined in 8-10 fields ( $\text{mm}^2$ ; each field represents an area of 0.7-0.84  $\text{mm}^2$ ) using the program LSM 5 Image Browser (Zeiss).

**Western Blot.** The left ventricle was lysed in a buffer containing 10 mM TRIS (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM NaF, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% triton X-100, 0.5% nonidet P-40, and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of leupeptin and aprotinin. The homogenate was centrifuged for 10 min, the supernatant frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The BioRad assay was used to determine protein content. The lysate (100  $\mu\text{g}$ ) was subjected to SDS-polyacrylamide gel (10%) electrophoresis, and protein was subsequently transferred to a PVDF membrane (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA). Immunoblotting was performed as previously described (El-Helou et al., 2005). Antibodies used were the mouse monoclonal anti-connexin-43 (1:1000; Chemicon); a rabbit polyclonal anti-Ser<sup>368</sup> connexin-43 (1:1000; Cell Signaling), and a mouse monoclonal anti-GAPDH (1:10,000; Ambion). The secondary antibody used was either a goat anti-mouse or goat anti-rabbit conjugated to horseradish peroxidase (1:10,000 Santa Cruz Biotechnology, California, USA). The immunoreactive protein signal was visualized by an ECL detection kit (Perkin Elmer). Films were scanned with a laser densitometer utilizing the program Quantity One (PDI Company, PDR version 2.7.1, New York, NY) and the data depicted as arbitrary light units normalized to glyceraldehyde phosphate

dehydrogenase (GAPDH) protein expression. Connexin-43 Ser<sup>368</sup> phosphorylation was normalized to connexin-43 protein content.

**Statistical Analysis.** All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. A two-way analysis of variance was performed to assess changes in body weight, cardiac morphology, hemodynamics, gene expression and collagen content in rats fed a standard or high fat diet subjected to ischemia/reperfusion injury. A significant difference was determined by the Bonferroni post-hoc test and a *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. A student's unpaired t-test was performed to assess scar remodelling, protein expression and immunofluorescent data and a *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. A Chi-square test (SAS version 9.1; SAS Institute Inc., Cary, North Carolina) was performed to compare the number of arrhythmic events and death of rats fed a high fat or standard diet subjected to an ischemic insult and a *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**Body and heart weights, hemodynamics and plasma lipid profile of female rats fed a standard or high fat diet.** A modest non-significant increase in body weight was observed in female rats fed a high fat diet for a period of 8 weeks as compared to rats fed a standard diet (Table I). Despite a modest change in body weight, left and right ventricle-to-body weight ratios were similar in rats fed either a standard or high fat diet (Table I). Systolic and diastolic blood pressures, mean arterial pressure (MAP), left ventricular systolic pressure, and dP/dt indices were significantly ( $p < 0.05$ ) increased in female rats fed a high fat diet (Table II). Lastly, plasma cholesterol, HDL, LDL and triglyceride levels in female rats fed a high fat diet were similar to rats fed a standard diet (Table III).

**Complete coronary artery ligation and ischemia/reperfusion (I/R) injury of the heart of rats fed either a standard or high fat diet.** Following complete coronary artery ligation of the heart of female rats fed a standard diet, 3 of 15 rats died within 24 hours of surgery. By contrast, the mortality rate was significantly greater ( $p < 0.0001$  versus standard

diet) in rats fed a high fat diet as 17 of 19 rats died within 24 hours after complete occlusion. Following I/R injury, 1 of 21 rats fed a standard diet died within 24 hours. A significantly higher mortality rate ( $p < 0.01$  versus standard diet) was observed in rats fed a high fat diet as 13 of 28 rats died within 24 hrs post I/R injury. Furthermore, a greater number of rats (standard 14% versus high fat 43%;  $p < 0.05$  versus standard diet) fed a high fat diet exhibited an arrhythmic event (Figure 1) and the onset of ventricular extrasystoles was earlier after coronary artery occlusion (standard,  $7.9 \pm 0.59$  versus high fat,  $3 \pm 0.42$  minutes;  $p < 0.0001$  versus standard diet).

**Cardiac and scar remodeling following I/R injury.** Following I/R injury to the heart of rats fed a standard diet, infarct size was predominantly small and associated with a modest significant decrease of systolic/diastolic blood pressures and left ventricular relaxation (Tables II & III). Left ventricle-body weight ratio in the ischemically damaged heart of rats fed a standard diet was similar to the non-infarcted heart, thereby suggesting the absence of significant cardiac remodeling (Table I). Indeed, the steady-state mRNA levels of ANP (sham,  $1.2 \pm 0.10$  versus IR,  $1.9 \pm 0.42$ ;  $n = 3-5$  for each group) and ventricular collagen  $\alpha_1$  type 1 protein content (sham,  $0.015 \pm 0.005$  versus  $0.0310 \pm 0.011$ ;  $n = 5-6$  for each group) were not significantly different in sham and I/R rats fed a standard diet. Following I/R injury, MAP and left ventricular contractility were significantly decreased in rats fed a high fat (Table II), albeit infarct size, thickness and scar collagen were similar to that observed in the infarcted heart of rats fed a standard diet (Table IV). In the non-infarcted left ventricle of rats fed a high fat diet, the steady-state mRNA levels of ANP (sham,  $1.0 \pm 0.14$  versus I/R,  $2.1 \pm 0.53$ ;  $n = 3-5$  for each group) and ventricular collagen  $\alpha_1$  type 1 protein content (sham,  $0.011 \pm 0.001$  versus I/R,  $0.020 \pm 0.011$ ;  $n = 5$  for each group) were not significantly increased following I/R injury. Lastly, I/R injury did not alter the plasma lipid profile of rats fed a standard diet or high fat diet (Table III).

**Induced ventricular extrasystoles in rats fed a high fat diet.** The higher mortality rate and incidence of ventricular extrasystoles in the ischemically damaged hearts of female rats fed a high fat diet suggested that the primary cause of death was a predisposition to cardiac arrhythmias. To further investigate the latter premise, additional experiments were performed to determine whether stimulating the non-ischemic heart of rats fed a high fat

diet was associated with a greater prevalence of cardiac arrhythmias. In the right ventricle, the effective refractory periods were similar in the heart of rats fed a standard and high fat diet (Table V). In both groups, extra-stimulations immediately after the refractory period led to the induction of ventricular tachycardia defined by the appearance of a minimum of 10 successive extrasystoles. In female rats fed a high fat diet (n=11), the number of animals that manifested an arrhythmic event was greater but did not reach statistical significance (standard 33% versus high fat 64%; p=0.17 versus standard diet). However, the number of ventricular tachycardias in rats fed a high fat diet were (standard,  $0.56 \pm 0.29$  versus high fat  $3.4 \pm 1.2$ ; p<0.05 versus standard diet) were significantly higher compared to rats fed a standard diet (n=9).

**Sympathetic fibre hyperinnervation and gap junctional protein expression and distribution in the heart of rats fed a high fat diet.** In the left ventricle of rats fed a high fat diet for 8 weeks, sympathetic hyperinnervation was observed reflected by the increased density of neurofilament-M immunoreactive fibres (standard,  $2020 \pm 260$  versus high fat,  $2830 \pm 250 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ ; n=6-7 for each group; p<0.05 versus standard) and tyrosine hydroxylase protein content (standard,  $0.57 \pm 0.07$  versus high fat,  $0.99 \pm 0.11$ ; n=6 for each group; p<0.01 versus standard) (Figure 2). Despite sympathetic hyperinnervation, the steady state mRNA levels of NGF- $\beta$  in the left ventricle of rats fed a high fat diet ( $0.73 \pm 0.06$ ; n=6) was similar to rats fed a standard diet ( $0.84 \pm 0.05$ ; n=6).

Connexin-40 protein expression in the left ventricle was undetectable by a Western blot approach. However, an immunofluorescence revealed modest connexin-40 immunoreactivity at intercalated discs of ventricular myocytes and the signal was absent in the heart of rats fed a high fat diet (Figure 3). A Western blot approach revealed that connexin-43 protein content (standard,  $0.45 \pm 0.06$  versus high fat,  $0.91 \pm 0.19$ ; n=6 for each group; p<0.05 versus standard) was significantly increased in the left ventricle of rats fed a high fat diet (Figure 2). However, phosphorylation of the Ser<sup>368</sup> residue of connexin-43 was reduced (standard,  $1.76 \pm 0.34$  versus high fat,  $0.44 \pm 0.14$ ; n=6 for each group; p<0.01 versus standard) in the heart of rats fed a high fat diet (Figure 2). Diminished connexin-43 phosphorylation in the heart of rats fed a high fat diet was associated with lateralization

and/or cytoplasmic staining of the gap junctional protein in ventricular myocytes (Figure 3).

## **DISCUSSION**

Work from our lab has demonstrated that mean arterial pressure was increased in the heart of female rats fed a high fat diet in the absence of overt obesity, hyperlipidemia and hyperglycaemia (Aubin et al., 2008). The present study has further revealed that the heart of rats fed a high fat diet was associated with an arrhythmogenic phenotype, characterized by an increased incidence of induced ventricular extrasystoles. Possible underlying mechanisms include sympathetic hyperinnervation and an aberrant pattern of gap junctional protein expression and distribution. By contrast, the heart of rats fed a high fat diet were not predisposed to abnormal scar formation and healing following IR injury. Nonetheless, these rats were sensitive to an ischemic insult as the mortality rate and incidence of cardiac arrhythmias were significantly greater than rats fed a standard diet.

Previous studies have demonstrated that I/R injury to the heart of animals characterized with overt obesity led to scar expansion and impaired healing (du Toit et al., 2008; Thakker et al., 2006). Furthermore, inadequate scar healing represents an underlying event contributing to left ventricular dilatation and subsequent adverse remodeling (Thakker et al., 2006; Dai et al., 2005). An ischemic insult was superimposed on the heart of female rats fed a high fat to determine whether the reparative fibrotic response was compromised. Complete coronary artery ligation of the heart of rats fed a high fat diet led to an 89% mortality rate within 24 hrs after occlusion and was significantly higher compared to rats fed a standard diet subjected to an ischemic insult. The mortality rate and the number of rats that manifested an arrhythmic event following I/R injury was likewise higher in rats fed a high fat diet compared to rats fed a standard diet. Moreover, the onset of ventricular extrasystoles following coronary artery occlusion was earlier in the heart of rats fed a high fat diet. Collectively, these data support the premise that the heart of rats fed a high fat diet was associated with an arrhythmogenic phenotype. One week following I/R injury, infarct length, thickness, collagen content and remodeling of the non-infarcted myocardium were comparable in rats fed a standard or high fat diet. In addition, infarct size was

predominantly small in both groups and consistent with previous studies demonstrating that the female rat heart was more resistant to ischemic damage (Bae and Zhang, 2005; Johnson et al., 2006). Moreover, the underlying presence of a hypertensive state in rats fed a high fat diet did not lead to greater infarct expansion (Kenchiah et al., 2004; Mozaffari and Schaffer, 2003; Jain et al., 2002). Thus, despite an increased risk of cardiac arrhythmias, the reparative fibrotic response was not compromised in the ischemically damaged heart of female rats fed a high fat. In this regard, scar expansion and inadequate healing following an ischemic insult may only be prevalent following the onset of overt obesity associated with hyperlipidemia and/or hyperglycaemia (du Toit et al., 2008; Thakker et al., 2006).

Previous studies have reported that obese patients with or without left ventricular contractile dysfunction were associated with a greater risk of cardiac arrhythmias (Pietrasik et al., 2007; Poirier et al., 2006). The present study has demonstrated that the imposition of an ischemic insult to the heart of female rats fed a high fat diet decreased survival post injury and was associated with an increased incidence of cardiac arrhythmias despite the absence of overt obesity. To further validate the premise that the heart of female rats fed a high fat diet exhibited an arrhythmogenic phenotype, electrophysiology studies were performed to assess the incidence of induced ventricular extrasystoles. A higher number of female rats fed a high fat diet manifested an arrhythmic event following extra-stimulations of the non-ischemic heart and the number of ventricular tachycardias was significantly increased compared to rats fed a standard diet. Collectively, these data reaffirm the premise that the heart of female rats fed a high fat diet was associated with an arrhythmogenic phenotype prior the establishment of overt obesity and in the absence of hyperlipidemia and hyperglycaemia.

Myocardial fibrosis represents an underlying mechanism linked to cardiac arrhythmias (Avitall et al., 2008; Burstein et al., 2008). Employing Sirius Red staining, collagen  $\alpha_1$  type 1 protein content in the left ventricle of rats fed a high fat diet was similar to rats fed a standard diet. Thus, the arrhythmogenic phenotype of the heart of rats fed a high fat diet was not secondary to a prevailing fibrotic environment. By contrast, several lines of evidence in both patients and animal models support the premise that obesity-induced hypertension was related to the increased sympathetic nerve activity (Levin et al., 1983; Stocker et al., 2007; Alvarez et al., 2002). In the ischemically damaged heart, sympathetic

fibre sprouting was reported and identified as a seminal trigger of cardiac arrhythmias and sudden death (El-Helou et al., 2005; Vracko et al., 1990; Zhang et al., 2001; Zhou et al., 2004; Cao et al., 2000 & 2000a). Collectively, these observations provided the impetus to test the hypothesis that the greater incidence of spontaneous and inducible cardiac arrhythmias in female rats fed a high fat diet was associated at least in part with sympathetic hyperinnervation of the heart. Indeed, in the left ventricle of rats fed a high fat diet for 8 weeks, the density of neurofilament-M immunoreactive fibres was significantly increased and associated with elevated tyrosine hydroxylase protein content. In the ischemically damaged heart, synthesis of the neurotrophin NGF- $\beta$  and its subsequent uptake and retrograde transport by the left stellate ganglion was identified as a seminal event implicated in sympathetic fibre sprouting (Zhou et al., 2004; Hassankhani et al., 1995). In the present study, left ventricular steady state mRNA levels of NGF- $\beta$  were similar in female rats fed a high fat and standard diet. Nonetheless, adipose tissue was identified as an important source of numerous peptides including NGF- $\beta$  and levels of the neurotrophin were increased in obese patients (Fain et al., 2005; Bullo et al., 2007). Although, plasma levels were not measured in the present study, a high fat diet may have induced NGF- $\beta$  synthesis from an extra-cardiac source and contributed in part to the sympathetic hyperinnervation of the heart. Alternatively, in the absence of a change in NGF- $\beta$  expression, hypercholesterolemia alone promoted cardiac sympathetic hyperinnervation and the heart was associated with increased vulnerability to ventricular fibrillation (Liu et al., 2003). However, sympathetic hyperinnervation of the heart of rats fed a high fat diet for 8 weeks cannot be attributed to hypercholesterolemia, as plasma cholesterol levels were normal.

Gap junctional proteins located at the intercalated disc of cardiac myocytes play a seminal role in action potential propagation and a decreased expression and/or redistribution contributes to the generation of an arrhythmogenic substrate (Akar et al., 2004; Severs et al., 2008; Rucker-Martin et al., 2006). Previous studies have demonstrated that connexin-43 represents the major gap junctional protein isoform expressed in the ventricles, whereas connexin-40 expression is either modest or undetectable (Severs et al., 2008). Consistent with this premise; a Western blot approach was unable to detect an appreciable level of connexin-40 protein whereas connexin-43 expression was robust.

However, a modest connexin-40 immunoreactive signal was detected exclusively at the intercalated discs of ventricular myocytes in the normal rat heart. In the heart of rats fed a high fat diet, the connexin-40 immunoreactive signal was absent. Although, the latter finding demonstrates that connexin-40 expression was sensitive to a high fat diet, the biological impact of this modest population on cardiac arrhythmogenicity in the rat heart remains presently undefined (Severs et al., 2008). By contrast, connexin-43 represents the predominant ventricular isoform and its expression was increased in the heart of rats fed a high fat diet. Despite the latter finding, Ser<sup>368</sup> phosphorylation of connexin-43 was significantly reduced in the heart of rats fed a high fat diet. A previous study reported that decreased phosphorylation of connexin-43 in the non-ischemic failing dog heart was associated with an aberrant pattern of distribution that may contribute in part to cardiac arrhythmias (Akar et al., 2004). Indeed, connexin-43 immunoreactivity was redistributed along the lateral membrane and/or detected in the cytoplasm of numerous ventricular myocytes in the heart of rats fed a high fat diet. Consistent in part with our findings, a disparate pattern of vascular connexin-40 and connexin-43 protein expression was reported in atherosclerotic plaques of low-density lipoprotein-deficient mice fed a high fat diet and in human umbilical endothelial cells exposed to TNF- $\alpha$  (Kwak et al., 2002; VanRijen et al., 1998). Consequently, sympathetic hyperinnervation of the heart and the concomitant altered expression and distribution of gap junctional proteins represent a potential trigger and substrate, respectively, for the generation of cardiac arrhythmias in female rats fed a high fat diet.

In the absence of overt obesity, hyperlipidemia and hyperglycaemia, the heart of female rats fed a high fat diet were associated with an arrhythmogenic phenotype. Sympathetic hyperinnervation of the heart and an aberrant pattern of expression and distribution of gap junctional proteins may represent underlying mechanisms. By contrast, a high fat diet did not compromise the reparative fibrotic response of the ischemically damaged female rat heart. However, the pre-existing arrhythmogenic phenotype predisposed these rats to a higher mortality rate following an ischemic insult. Clinically, obese patients are hypertensive, associated with a greater risk of cardiac arrhythmias and elevated circulating NGF- $\beta$  levels (Poirier et al., 2006; Pietrasik et al., 2007; Bullo et al., 2007). Thus, based on the findings of the present study, it is tempting to speculate that a high fat diet (e.g. Western

diet) may predispose individuals to a greater risk of cardiac arrhythmias in the absence of overt obesity.

**Acknowledgements.** This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada and Quebec, Canadian Institutes of Health Research, and "Fonds de la Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal" (FRICM). Marie-Claude Aubin is a PhD student funded by the Heart and Stroke Foundation of Canada. Louis P. Perrault is a Chercheur-Boursier Senior and Angelino Calderone is a Chercheur-Boursier National of the 'Fonds de la Recherche en Santé du Québec' (FRSQ). Stanely Nattel is funded by the Canadian Institutes of Health Research (Award MOP 68929) and the Quebec Heart and Stroke Foundation. Philippe Comtois is funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council and the MITACS. The authors would like to thank Marie-Pierre Mathieu for technical assistance, Asmaa Mansour for statistical analysis and France Thériault for excellent secretarial assistance.

## REFERENCES

- Akar FG, Spragg DD, Tunin RS, et al (2004) Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* **95**:717-25.
- Alvarez GE, Beske SD, Ballard TP, et al (2002) Sympathetic neural activation in visceral obesity. *Circulation* **106**:2533-6.
- Aubin MC, Lajoie C, Clément R, et al (2008) Female Rats Fed a High Fat Diet Were Associated with Vascular Dysfunction and Cardiac Fibrosis in the Absence of Overt Obesity and Hyperlipidemia: Therapeutic Potential of Resveratrol. *J Pharmacol Exp Ther* **325**:961-8.
- Avitall B, Bi J, Mykitysey A, et al (2008) Atrial and ventricular fibrosis induced by atrial fibrillation: evidence to support early rhythm control. *Heart Rhythm* **5**:839-45.
- Bae S, Zhang L. (2005) Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: Focus on AKT and protein kinase C signalling. *J Pharmacol Exp Ther* **315**:1125-35.
- Bullo M, Peeraully MR, Trayhurn P, et al (2007) Circulating nerve growth factors levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. *Eur J Endocrinol* **157**:303-10.
- Burstein B, Nattel S (2008) Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* **51**:802-9.
- Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, et al (2000) Nerve sprouting and sudden cardiac death. *Circ Res* **86**:816-21.
- Cao JM, Fishbein MC, Han JB, et al (2000a) Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation* **101**:1960-9.
- Dai W, Wold LE, Dow JS, Kloner RA (2005) Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats. *J Am Coll Cardiol* **46**:714-9.
- du Toit EF, Smith W, Muller C, et al (2008) Myocardial susceptibility to ischemic-reperfusion injury in a prediabetic model of dietary-induced obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**:H2336-43.
- El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, et al (2005) Resident nestin<sup>+</sup> neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium. *Hypertension* **46**:1219-25.
- Fain JN, Tichansky DS, Madan AK (2005) Most of the interleukin 1 receptor antagonist, cathepsin S, macrophage migration inhibitory factor, nerve growth factor, and

- interleukin 18 release by explants of human adipose tissue in by non-fat cells, not by the adipocytes. *Metab Clin Exp* **55**:1113-21.
- Gosselin H, Qi X, Rouleau JL (1998) Correlation between cardiac remodelling, function, and myocardial contractility in rat hearts 5 weeks after myocardial infarction. *Can J Physiol Pharmacol* **76**:53-62.
- Hassankhani A, Steinhelper ME, Soonpaa MH, et al (1995) Overexpression of NGF within the heart of transgenic mice causes hyperinnervation, cardiac enlargement and hyperplasia of ectopic cells. *Develop Biol* **169**:309-21.
- Jain M, Liao R, Podesser BK, et al (2002) Influence of gender on the response to hemodynamic overload after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**:H2544-50.
- Johnson MS, Moore RL, Brown DA (2006) Sex differences in myocardial infarct size are abolished by sarcolemmal  $K_{ATP}$  channel blockade in rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**:H2644-7.
- Kenchaiah S, Pfeffer MA, St John Sutton M, et al (2004) Effect of antecedent systemic hypertension on subsequent left ventricular dilatation after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* **94**:1-8.
- Kwak BR, Mulhaupt F, Veillard N, et al (2002) Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:225-30.
- Levin BE, Triscari J, Sullivan AC (1983) Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity in the rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **244**:R347-55.
- Liu YB, Wu CC, Lu LS, et al (2003) Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling, and increased vulnerability to ventricular fibrillation in hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* **92**:1145-52.
- Mozaffari MS, Schaffer SW (2003) Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury. *Hypertension* **42**:1042-9.
- Pietrasik G, Goldenberg I, McNitt S, et al (2007) Obesity as a risk factor for sustained ventricular tachyarrhythmias in MADIT II patients. *J Cardiovasc Electrophysiol* **18**:181-4.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA, et al (2006) Obesity and cardiovascular disease : Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Circulation* **113**:898-918.

- Rucker-Martin C, Milliez P, Tan S, et al (2006) Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts. *Cardiovas Res* **72**:69-79.
- Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S (2008) Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res* **80**:9-19.
- Stocker SD, Meador R, Adams JM (2007) Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. *Hypertension* 49(part 2):640-6.
- Thakker GD, Frangogiannis NG, Bujak M, et al (2006) Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**:H2504-14.
- VanRijen HVM, VanKempfen MJA, Postma S, Jongsma HJ (1998) Tumour necrosis factor alpha alters the expression of connexin43, connexin40, and connexin37 in human umbilical vein endothelial cells. *Cytokine* **10**:258-60.
- Vracko R, Thorning D, Frederickson RG (1990) Fate of nerve fibers in necrotic, healing and healed rat myocardium. *Lab Invest* **63**:490-501.
- Zhang LQ, Laato M (2001) Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat. *Ann Chir Gynaecol* **90**:29-32.
- Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, et al (2004) Mechanisms of cardiac nerve fiber sprouting after myocardial infarction in dogs. *Circ Res* **95**:76-83.

## LEGENDS

**Figure 1.** Ventricular arrhythmias during coronary artery ligation. (Panel **A** and **B**) ECG recordings depicting the induction of ventricular tachycardia during the occlusion of coronary artery of the heart of a female rat fed a high fat diet.

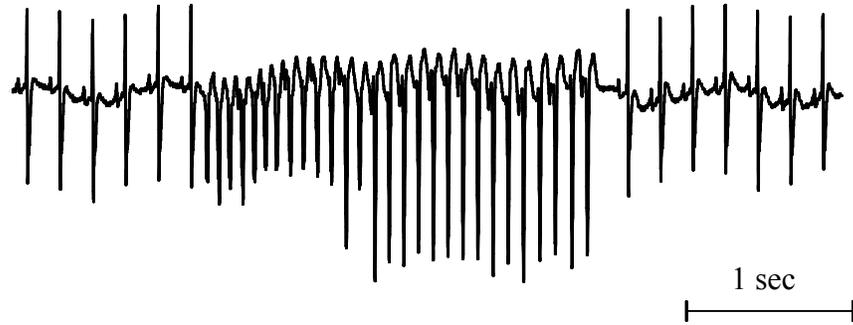
**Figure 2.** Tyrosine hydroxylase and connexin-43 protein expression and phosphorylation. Tyrosine hydroxylase (TH) and connexin-43 (Cx43) protein content were elevated in the heart of rats fed a high fat diet. Despite elevated protein expression, Ser<sup>368</sup> phosphorylation of Cx43 was reduced in the heart of rats fed a high fat diet. GAPDH protein levels were similar in the heart of rats fed a standard or high fat diet.

**Figure 3.** Expression and distribution of gap junctional proteins. (Panel **A**) Modest connexin-40 immunoreactivity was detected at the intercalated discs of ventricular cardiac myocytes in the normal rat heart whereas (Panel **B**) staining was absent in the heart of rats fed a high fat diet. (Panel **C**) Robust connexin-43 immunoreactivity was detected at the intercalated discs of normal rat cardiac myocytes. (Panel **D**) In the heart of rats fed a high fat diet, connexin-43 staining was observed at the intercalated discs. However, connexin-43 immunoreactivity was also detected along the lateral membrane and/or in the cytoplasm of numerous cardiac myocytes (indicated by arrow). To-Pro<sup>3</sup> staining (blue fluorescence) was used to label the nucleus.

FIGURES

Figure 1

A)



B)



Figure 2

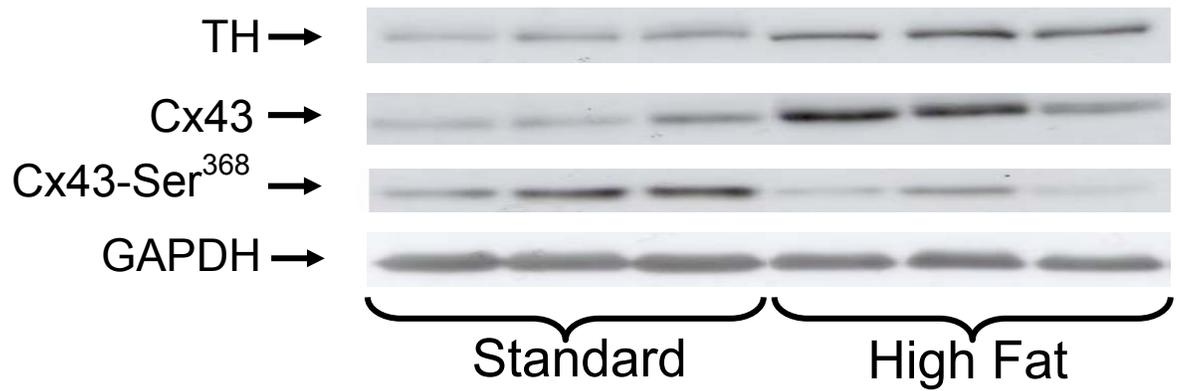
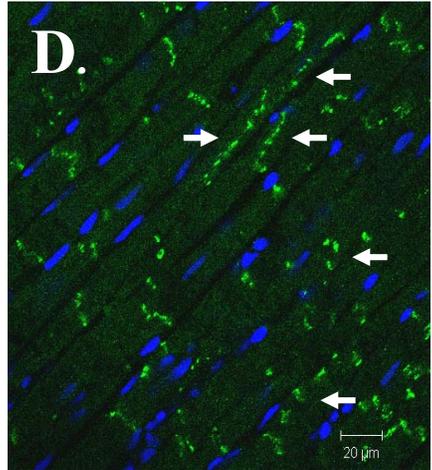
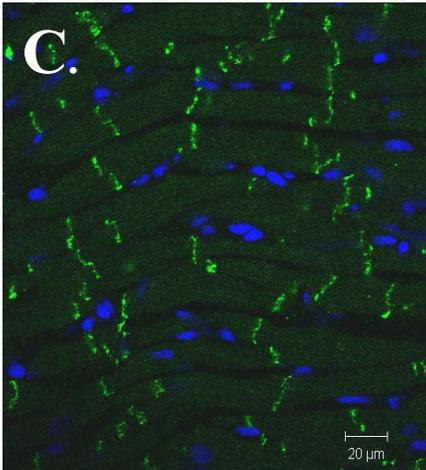
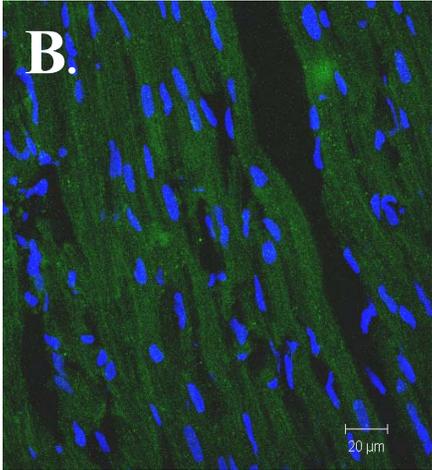
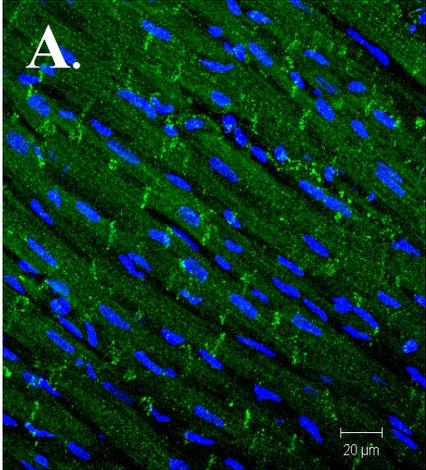


Figure 3



**TABLES**

**Table I.** Body and Heart Weights in female rats fed a standard or high fat diet and subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury

	<b>Standard</b> (n = 6)	<b>High Fat</b> (n = 6)	<b>Standard I/R</b> (n = 11)	<b>High Fat I/R</b> (n = 6)
Final body weight (g)	303 ± 9	339 ± 20	334 ± 11	338 ± 10
Left ventricle weight (g)	0.40 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.49 ± 0.01
Right ventricle weight (g)	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.01
LV/B weight ratio (x 10 <sup>3</sup> )	1.34 ± 0.04	1.36 ± 0.06	1.37 ± 0.04	1.46 ± 0.03
RV/B weight ratio (x 10 <sup>3</sup> )	0.45 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.54 ± 0.03

Data are presented as mean ± SEM; n= number of rats per group. BW denotes body weight; LV, left ventricle and RV, right ventricle.

**Table II.** MAP and left ventricular contractility in female rats fed a standard or high fat diet and subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury

	<b>Standard</b> (n = 6)	<b>High Fat</b> (n = 6)	<b>Standard I/R</b> (n = 19)	<b>High Fat I/R</b> (n = 15)
Systolic pressure (mmHg)	136 ± 8	180 ± 5*	111 ± 5*	115 ± 5**
Diastolic pressure (mmHg)	97 ± 4	112 ± 2*	80 ± 3*	84 ± 2**
Mean arterial pressure (mmHg)	110 ± 6	135 ± 3*	90 ± 4*	94 ± 3**
LV systolic pressure (mmHg)	121 ± 5	157 ± 8*	110 ± 5	110 ± 5**
LV + dP/dt (mmHg/sec)	6042 ± 107	7224 ± 310*	5361 ± 165	5496 ± 136**
LV - dP/dt (mmHg/sec)	-5078 ± 305	-6302 ± 337*	-4204 ± 177*	-4367 ± 130**

Data are presented as mean ± SEM; n= number of rats per group, and LV denotes left ventricle. \* p<0.05 versus standard diet; \*\*p<0.05 versus high fat diet.

**Table III.** Lipid profile in female rats fed a standard or high fat diet and subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury

	<b>Standard</b> ( <i>n</i> = 4)	<b>High Fat</b> ( <i>n</i> = 5)	<b>Standard I/R</b> ( <i>n</i> = 4)	<b>High Fat I/R</b> ( <i>n</i> = 5)
Cholesterol (mmol·L <sup>-1</sup> )	1.59 ± 0.14	1.47 ± 0.09	1.53 ± 0.09	1.64 ± 0.14
HDL (mmol·L <sup>-1</sup> )	0.50 ± 0.05	0.41 ± 0.04	0.52 ± 0.05	0.46 ± 0.04
LDL (mmol·L <sup>-1</sup> )	0.54 ± 0.09	0.50 ± 0.08	0.55 ± 0.09	0.78 ± 0.18
Triglycerides (mmol·L <sup>-1</sup> )	1.20 ± 0.23	1.03 ± 0.25	1.04 ± 0.22	0.99 ± 0.18

Data are presented as mean ± SEM; n= number of rats per group. HDL denotes high density lipoproteins and LDL, low density lipoproteins.

**Table IV.** Scar planimetry and collagen content in female rats fed a standard or high fat diet subjected to ischemia/reperfusion (I/R) injury

	<b>Scar thickness</b> (cm)	<b>Scar length</b> (cm)	<b>Collagen</b> (arbitrary units/mm <sup>2</sup> )	<b>Infarct size</b> (% of total area)
Standard I/R ( <i>n</i> = 6)	0.047 ± 0.017	0.288 ± 0.094	0.21±0.04	9.00 ± 4.49
High fat I/R ( <i>n</i> = 5)	0.059 ± 0.008	0.320 ± 0.134	0.20±0.04	11.83 ± 4.23

Data are presented as mean ± SEM; n= number of rats per group.

**Table V.** Effective ventricular refractory period in female rats fed a standard or a high fat diet

	<b>Standard</b> ( <i>n</i> = 9)	<b>High-fat</b> ( <i>n</i> = 11)
EVRP 100ms (ms)	76 ± 4	72 ± 2
EVRP 100ms + 1 extra (ms)	68 ± 4	66 ± 3
EVRP 100ms + 2 extra (ms)	73 ± 4	66 ± 4
EVRP 200ms (ms)	68 ± 4	66 ± 2
EVRP 200ms + 1 extra (ms)	56 ± 4	59 ± 2
EVRP 200ms + 2 extra (ms)	68 ± 4	64 ± 5

Data are presented as mean ± SEM; n= number of rats per group. EVRP: Effective ventricular refractory period; extra: extrastimulation.

**Supplemental Table.** MAP and left ventricular contractility in female rats fed a standard or high fat diet

	<b>Standard</b> ( <i>n</i> = 7)	<b>High Fat</b> ( <i>n</i> = 7)
Systolic pressure (mmHg)	128 ± 8	172 ± 8*
Diastolic pressure (mmHg)	93 ± 6	109 ± 3*
Mean arterial pressure (mmHg)	105 ± 6	130 ± 5*
LV systolic pressure (mmHg)	116 ± 4	150 ± 9*
LV + dP/dt (mmHg/sec)	5870 ± 282	7052 ± 313*
LV - dP/dt (mmHg/sec)	-4910 ± 308	-6048 ± 382*

Data are presented as mean ± SEM; n= number of rats per group. LV: Left ventricle.

## CHAPITRE HUITIÈME : DISCUSSION

---

La relation entre l'obésité et le développement de maladies cardiovasculaires est univoque, tant chez l'humain que dans divers modèles expérimentaux. Malgré ces observations, de nombreuses lacunes subsistent à savoir quelles sont les modifications pathologiques qui surviennent avant l'établissement de l'obésité, de la dyslipidémie et de l'hyperglycémie. Le présent projet a démontré que l'administration d'une diète riche en gras pour une période de 8 semaines chez des rats femelles était associée à une augmentation significative de la pression artérielle et au développement d'une fibrose périvasculaire myocardique, malgré une augmentation non-significative de la masse corporelle ainsi que la présence d'un profil lipidique et glycémique normal. De plus, le développement de l'hypertension des rats ayant reçu la diète riche en gras était prévenu par l'administration concomitante de l'antioxydant resvératrol. Par contre, le bénéfice thérapeutique était limité du point de vue vasculaire puisque le traitement au RES n'a pas atténué la réponse fibrotique périvasculaire dans le cœur des rats ayant reçu la diète riche en gras.

L'imposition d'un stress ischémique cardiaque a démontré que l'administration de la diète riche en gras n'était pas associée à une formation inadaptée de la cicatrice. En effet, le remodelage cicatriciel (taille, épaisseur, contenu en collagène) et cardiaque (ratio masse ventriculaire gauche/masse corporelle) n'étaient pas altérés suite à l'insulte d'I/R comparativement aux rats femelles ayant reçu une diète standard. Toutefois, le taux de décès était significativement plus élevé, suggérant une prédisposition accrue aux arythmies cardiaques suite à l'administration de la diète riche en gras. Les études d'électrophysiologie ont démontré une augmentation du nombre d'extrasystoles ventriculaires induites par une stimulation électrique. Ce profil arythmogénique peut en partie être attribué à une hyperinnervation sympathique mature puisque la densité des neurofilaments M<sup>+</sup> était significativement augmentée, accompagnée d'une élévation de l'expression protéinique de l'hydroxylase de la tyrosine. L'hyperinnervation sympathique ventriculaire était combinée à une altération de la localisation et de la phosphorylation des jonctions intercellulaires (Cx43) ainsi qu'une diminution de l'expression des Cx40, suggérant un remodelage

inadapté pour la conduction du potentiel d'action entre les cardiomyocytes. Ces principales découvertes démontrent ainsi qu'en l'absence d'une obésité établie, d'une dyslipidémie et d'une hyperglycémie, des modifications hémodynamiques et arythmogéniques surviennent suite à l'administration d'une diète riche en gras chez des rats femelles.

**Choix du modèle.** Les modèles génétiques de résistance à l'insuline (*ob/ob*) ou de diabète (*db/db*) sont communément utilisés afin d'étudier les mécanismes physiologiques et pharmacologiques reliés à l'obésité. Ces deux modèles murins d'obésité sont avantageux pour approfondir certains aspects cardiovasculaires associés à cette altération du métabolisme [355]. Par contre, les mutations du gène de la leptine (*ob/ob*) ou de son récepteur (*db/db*) sont rarement rencontrées chez l'homme, rendant ces modèles génétiques moins représentatifs de la situation réelle. En effet, l'épidémie de l'obésité résulte principalement d'un débalancement énergétique secondaire à la consommation d'une diète riche en gras, en sucrose ou en calorie, combinée à un style de vie sédentaire. De plus, l'obésité se développe conjointement à plusieurs autres anomalies dans les modèles génétiques [446]. La leptine possède des effets au niveau du système immunitaire, tel que démontré par l'atrophie du thymus chez les souris *db/db* [447]. Plusieurs évidences supportent également un rôle pro-inflammatoire pour la leptine [448]. Ainsi, ces altérations immunitaires retrouvées avec les modèles génétiques d'obésité rendent ces derniers moins intéressants pour l'étude des mécanismes reliés à l'infarctus du myocarde puisque la réparation cardiaque implique divers phénomènes inflammatoires. Également, l'hyperglycémie sévère retrouvée chez les modèles murins diabétiques peut affecter de manière négative le système cardiovasculaire. Ainsi, alors que les modèles génétiques peuvent être avantageux lors de certaines expérimentations, la présente étude a été réalisée avec un modèle représentatif du régime occidental afin de permettre l'étude des divers mécanismes de remodelage cardiaque et vasculaire.

Le choix du modèle utilisé afin de conduire les projets de cette thèse a été sélectionné en fonction des résultats démontrés dans une étude réalisée par Charbonneau et al. [449]. Dans cette dernière, l'administration de la diète riche en gras (42% de lipides) pour une période de 8 semaines chez des rats femelles n'a pas conduit vers l'établissement de l'obésité, ou même d'une surcharge pondérale significative. L'utilisation des rats mâles

aurait pu conduire vers un gain de masse corporelle similaire, c'est-à-dire comparable aux rats mâles ayant reçu une diète standard tel que suggéré par l'étude de Thakket et ses collègues [356]. Il a été démontré que, suite à l'administration d'une diète riche en gras (42% lipides, kcal) pour une période de 24 semaines, le gain de masse était similaire chez les rats mâles et femelles comparativement à leur contrôle respectif (diète standard; 13.5% lipides, kcal).

Toutefois, les niveaux de glucose à jeun et la sévérité de l'hyperinsulinémie étaient davantage prononcés chez les mâles comparativement aux femelles, conséquemment à une résistance sévère à l'insuline [356]. Puisque l'absence d'hyperinsulinémie, et d'hyperlipidémie, représentaient également des critères incontournables dans le choix du modèle, cette observation n'était pas à négliger. La grande majorité des études retrouvées dans la littérature ont évalué l'impact cardiovasculaire d'une diète riche en gras ou de l'obésité dans des modèles de dyslipidémie, d'intolérance au glucose ou de diabète de type II. Les manifestations pathologiques étaient alors attribuées, avec ou sans preuve directe, à l'augmentation des lipides ou à la dysfonction de l'action de l'insuline. Toutefois, certains mécanismes sous-jacents et indépendants de ces changements métaboliques peuvent également être impliqués dans le développement des altérations cardiovasculaires. La présente étude a donc été conduite afin de répondre à cette lacune, c'est-à-dire de déterminer l'atteinte cardiaque et vasculaire survenant précocement à une dyslipidémie, une hyperglycémie et une obésité.

En plus des différences mâle-femelle énumérées ci-haut, de nombreuses autres divergences sont établies, attestant que l'utilisation des mâles aurait pu conduire à un tout nouveau modèle suite à l'administration de la diète riche en gras. Dans un premier temps, les rats mâles spontanément hypertendus et les rats Wistar-Kyoto présentent une élévation significative de la pression artérielle comparativement aux femelles respectives. Ceci serait la conséquence d'une augmentation de la production vasculaire d'anions superoxyde ainsi que de la diminution subséquente de la biodisponibilité du NO pour les cellules musculaires lisses [450]. De plus, l'augmentation supérieure de la pression artérielle chez les souris mâles versus les femelles suite à une infusion chronique d'angiotensine II est attribuée à une augmentation de la participation du système nerveux sympathique [451]. La présence d'une pression sanguine inférieure chez les femelles peut être expliquée par l'effet

protecteur de l'estrogène. En effet, chez les rats femelles normotendus, l'ovariectomie augmente considérablement la pression sanguine [452] alors que la castration chez les rats mâles ne porte aucune atteinte [453]. De plus, Arnal et ses collègues ont démontré que l'estrogène synthétique estradiol éthyne résulte en une augmentation de la biodisponibilité du NO par une inhibition de la production d'espèces réactives oxygénées au niveau des cellules endothéliales aortiques bovines en culture [454]. Ainsi, dans la présente étude, la dysfonction endothéliale et l'augmentation de la pression artérielle auraient certainement été significativement supérieures avec des rats mâles, suite à l'administration de la diète riche en gras. Ceci aurait pu conduire à un remodelage cardiaque significatif qui se serait soldé par l'établissement d'une hypertrophie ventriculaire gauche. Ainsi, une augmentation du ratio ventricule gauche sur masse corporelle ainsi que de la fibrose interstitielle aurait pu être détectée.

La fibrose périvasculaire peut être la conséquence de deux principaux mécanismes, hémodynamique et non hémodynamique. En premier lieu, la surcharge de pression peut directement stimuler l'augmentation du métabolisme des protéines de la matrice extracellulaire [296]. Puisque les mâles tendent à présenter une augmentation supérieure de la pression artérielle relativement aux femelles [450, 451], il est possible que la fibrose périvasculaire intramyocardique aurait certainement davantage été présente suite à l'administration de la diète riche en gras avec l'utilisation de mâles. De plus, selon le principe de la fibrose réactive, une fibrose interstitielle aurait également pu être détectée au niveau myocardique en présence d'une hypertension artérielle plus élevée. En deuxième lieu, la fibrose peut être le résultat d'une accumulation des cellules inflammatoires au niveau sous-endothélial, suite à leur attachement aux molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. L'expression de ces molécules d'adhésion représente entre autre une conséquence de la diminution du facteur anti-inflammatoire NO [306, 307]. Tel que mentionné ci-haut, l'estrogène synthétique estradiol éthyne résulte en une augmentation de la biodisponibilité du NO par une inhibition de la production d'espèces réactives oxygénées [454]. De plus, l'estrogène est à l'origine d'une augmentation de l'activité de la eNOS, tel que démontré dans les cellules endothéliales humaines en culture [455], et ainsi d'une augmentation de la libération du facteur anti-inflammatoire NO. Ces mécanismes peuvent expliquer la diminution des niveaux de molécules d'adhésion endothéliales solubles suite

au traitement à l'œstrogène chez les femmes en santé [456]. Ainsi, l'hypothèse d'une fibrose périvasculaire davantage présente chez les rats mâles suite à l'administration de la diète riche en gras peut s'expliquer par le manque des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes conférées par l'œstrogène, conjointement à l'augmentation de la pression contre la paroi.

Chez les femmes, l'incidence de fibrillation et de tachycardie ventriculaire est significativement réduite comparativement aux hommes, alors que l'intervalle QT est prolongée [457-459]. De nombreuses différences des genres au niveau de la fonction des cardiomyocytes, de la transduction des signaux, de l'activité et de l'expression des canaux ioniques, des fonctions du système nerveux sympathique et de la croissance des cellules cardiaques peuvent être à l'origine de la variation de la susceptibilité aux arythmies [460-464]. À titre d'exemple, les lapins femelles présentent moins de courants repolarisants  $I_{KS}$  et les rats femelles ont une recapture plus lente du calcium dans les cardiomyocytes comparativement aux mâles, ce qui favorise la prolongation de l'intervalle QT et ainsi les arythmies de type torsade de pointe [465, 466]. La diminution de la susceptibilité à la fibrillation ventriculaire chez les rats femelles, normotendues et spontanément hypertendues est associée à une augmentation de l'expression des Cx43 comparativement aux mâles [467]. Également, les rats femelles présentent une densité significativement inférieure des récepteurs  $\beta$ -ADR, ainsi qu'une diminution de la réponse à une stimulation adrénergique [462]. Dans la présente étude, le phénotype arythmogénique démontré chez les rats femelles ayant reçu la diète riche en gras est associé à une hyperinnervation sympathique ainsi qu'une altération de l'expression et de la localisation des Cx43. Ainsi, puisque les rats mâles présentent d'emblée une augmentation de la réponse adrénergique ainsi qu'une diminution de l'expression des Cx43 relativement aux femelles, l'amplification de ces facteurs de risque par l'administration de la diète riche en gras aurait pu conduire à une potentialisation de l'incidence des arythmies ventriculaires et ainsi à une augmentation du taux de décès.

**Hypertension artérielle systémique et dysfonction endothéliale.** Dans la première partie de cette étude, il a été démontré que l'hypertension artérielle est associée à une diminution

des relaxations aortiques dépendantes de l'endothélium chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras. Collectivement, ces résultats suggèrent que la production du NO est diminuée et/ou sa biodisponibilité réduite suite à une augmentation de la production d'anions superoxyde. Afin de confirmer cette hypothèse, l'antioxydant RES a été ajouté dans les bains d'organes en présence des anneaux aortiques. Il est établi qu'à certaines concentrations, le RES peut induire des relaxations dépendantes ainsi qu'indépendantes de l'endothélium. De fait, il favorise les relaxations dépendantes de l'endothélium par une augmentation de l'amplitude de l'efflux potassique [408] ainsi que de l'expression de la eNOS [410]. Au niveau des cellules musculaires lisses, des concentrations suffisantes peuvent moduler à la hausse la cinétique d'ouverture des canaux potassiques et diminuer la sensibilité des myofilaments au  $Ca^{2+}$  [415]. Ces études ont démontré qu'une concentration minimale de  $10\mu M$  était requise pour induire une relaxation dépendante de l'endothélium, et supérieure à  $60\mu M$  pour générer une relaxation indépendante de l'endothélium [407, 417, 468]. En premier lieu, ces actions vasculaires sont écartées dans la présente étude puisque la concentration de RES ( $0,1\mu M$ ) ajoutée dans les bains d'organes est largement inférieure aux concentrations requises. En deuxième lieu, l'absence de modulation des cibles endothéliales et musculaires a été confirmée chez les animaux ayant reçu la diète standard par l'obtention de deux courbes concentration-réponse identiques, soit avec et sans la présence de RES  $0,1\mu M$ . Si le RES avait porté une atteinte bénéfique en faveur de la vasodilatation, une augmentation significative de la relaxation maximale aurait été détectée. Ainsi, la superposition des deux courbes atteste que l'impact bénéfique observé sur les anneaux aortiques des animaux ayant reçu la diète riche en gras provient d'une autre source. Somme toute, ces résultats suggèrent fortement que le stress oxydant et la diminution subséquente de la biodisponibilité du NO soient à l'origine de la dysfonction endothéliale aortique et que l'amélioration des relaxations dépendantes de l'endothélium soit la conséquence d'une neutralisation directe des espèces réactives oxygénées par le RES.

En présence de stress oxydant, l'anion superoxyde entre en contact avec le NO afin de générer le peroxynitrite et la biodisponibilité du facteur relaxant pour les CML sous-jacentes est ainsi diminuée. De plus, le peroxynitrite possède la capacité d'oxyder la tétrahydrobioptérine, soit un cofacteur nécessaire pour l'activité de la eNOS, induisant un découplage fonctionnel de l'enzyme et une génération de l'anion superoxyde aux dépens du

NO [245]. Cette diminution de la production du facteur relaxant couplée à la diminution de sa biodisponibilité suite à une neutralisation peuvent être à la source de la dysfonction endothéliale chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras. Il est également établi que le stress oxydant participe à la prédominance de l'expression des  $\alpha 1$ -ADRs vasculaires et à la diminution de celle des  $\beta$ -ADRs, contribuant ainsi à une augmentation de la vasoconstriction [277, 278, 469]. Par contre, dans la présente étude, les concentrations de phényléphrine nécessaires pour l'atteinte du 70% de la concentration maximale obtenue avec le chlorure de potassium sont similaires pour les anneaux aortiques isolés des animaux ayant reçu la diète riche en gras et la diète standard (résultats non présentés). Ceci suggère donc que le phénomène de surexpression des  $\alpha 1$ -ADRs n'est pas retrouvé chez les animaux hypertendus. Somme toute, la diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium caractérisant la dysfonction endothéliale pourrait participer à l'initiation et à la préservation de l'hypertension artérielle par une augmentation de la résistance vasculaire.

Afin d'être élevée de manière chronique, la régulation de la pression sanguine doit échapper au contrôle des mécanismes baroréflexes. Dans un modèle expérimental d'hypertension induite par l'angiotensine II, il a en effet été démontré que l'hypertension artérielle était couplée à une augmentation de l'activité sympathique cardiaque, secondaire à une désensibilisation des baroréflexes [470]. Chez les patients hypertendus, la domination du système sympathique est également retrouvée, secondaire à l'élévation du seuil d'inhibition de ce tonus [275, 471]. L'altération sympathique a été retrouvée chez les souris femelles hypertendues suite à l'injection d'Ang II mais était significativement moins importante que chez les souris mâles. En effet, la pression artérielle moyenne et l'augmentation de l'activité sympathique étaient plus élevées chez les mâles, appuyées par une abolition de la pente du baroréflexe suite à une stimulation avec la phényléphrine. La pratique de la gonadectomie a induit une augmentation des valeurs de la pression artérielle moyenne suite à l'injection de l'Ang II chez les femelles, suggérant une protection des hormones oestrogéniques [472]. Somme toute, malgré le fait que les altérations de l'activité sympathique soient moins importantes chez les femelles, elles sont tout de même présentes et pourraient expliquer le développement de l'hypertension artérielle chez les rats ayant reçu la diète riche en gras. Plusieurs évidences expérimentales et cliniques démontrent que le stress oxydant est élevé en présence d'hypertension. Des modèles expérimentaux d'hypertension génétique ou acquise ont démontré que la production basale d'anion

superoxyde ainsi que l'activité de l'oxydase de la NAD(P)H sont augmentées [310, 473]. Ces espèces réactives oxygénées semblent être à la source de la l'augmentation de la participation du tonus sympathique puisqu'un traitement antioxydant rétabli la sensibilité du système baroréflexe [474] et la balance sympatho-vagale [475]. Donc, tout comme pour le développement de la dysfonction endothéliale vasculaire, le stress oxydant pourrait être impliqué dans le développement et le maintien de l'hypertension artérielle chez les rats femelles ayant reçu la diète riche en gras, tel qu'appuyé par l'inhibition du développement des deux manifestations pathologiques vasculaires en présence du traitement chronique antioxydant avec le RES.

L'action antioxydante du RES administré de manière chronique peut s'être manifestée au niveau vasculaire par une modulation à la hausse du contenu cellulaire en glutathion et/ou de l'activité des enzymes antioxydantes telles la catalase et la dismutase du superoxyde [400, 401], en plus d'avoir aboli la production basale et stimulée d'anion superoxyde [476, 477]. Ainsi, la biodisponibilité du monoxyde d'azote se trouve préservée, expliquant la potentialisation des relaxations dépendantes de l'endothélium des animaux ayant reçu la diète riche en gras. Par contre, cette action antioxydante ne semble pas exclusive puisque chez les animaux ayant reçu la diète standard, le traitement chronique au RES potentialise également les relaxations dépendantes de l'endothélium relativement au groupe non traité. Selon Baur et Sinclair, l'administration de RES  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  entraîne une concentration plasmatique maximale de  $1,2 \text{ }\mu\text{M}$  par jour chez le rat [396], soit une concentration aigüe trop faible pour être directement à la source d'effets vasorelaxants directs (concentration minimale requise pour induire des relaxations dépendantes et indépendantes de l'endothélium :  $10 \text{ }\mu\text{M}$  et  $60 \text{ }\mu\text{M}$ , respectivement). Par contre, le paradoxe français trouve sa raison d'être dans la consommation modérée et prolongée de vin rouge puisque l'effet bénéfique de l'antioxydant se produit suite à une accumulation tissulaire significative. Ainsi, il est possible que les concentrations endothéliales et musculaires vasculaires soient suffisantes pour induire une modulation des canaux potassiques endothéliaux et calciques vasculaires (Li HF, *Physiol Res*, 2006), accompagnée d'une augmentation de l'expression de la eNOS [408, 411].

**Remodelage cardiaque et vasculaire.** Le maintien chronique d'une pression artérielle élevée est à la source du développement d'un remodelage cardiaque et vasculaire [71, 284, 305]. Dans un premier temps, une série d'évènements cellulaires et moléculaires se produit, menant à l'hypertrophie ventriculaire gauche adaptative. Par contre, dans la présente étude, aucun remodelage cardiaque n'a été détecté chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras. De fait, la morphologie (ratio masse ventriculaire gauche/cardiaque) ainsi que les niveaux de l'ARNm du peptide natriurétique auriculaire (ANP), de SERCA2a et des protéines impliqués dans la fibrose interstitielle (collagène  $\alpha_1$  de type 1) demeurent similaires aux animaux ayant reçu une diète standard. Cette absence de remodelage peut être expliquée par un niveau d'élévation insuffisant ou une durée trop courte de l'hypertension artérielle, ou par une implication des hormones sexuelles. En réponse à une augmentation de la charge cardiaque, les résultats d'études expérimentales et cliniques démontrent une diminution de la réponse hypertrophique chez les femelles comparativement aux mâles [463, 478]. Alors que la disparité mâle-femelle est également démontrée dans un modèle d'hypertension secondaire à une dénervation sino-aortique, l'œstradiol joue plutôt un rôle d'inhibition de la réponse hypertrophique alors que la testostérone facilite cette dernière [479]. Ainsi, l'implication potentielle des hormones sexuelles dans l'absence de réponse hypertrophique cardiaque chez les rats modestement hypertendus n'est pas à exclure.

La présence d'une hypertension artérielle soutenue est également à la source d'un remodelage vasculaire caractérisé par une hypertrophie (augmentation de l'épaisseur de la média) et une diminution du diamètre de la lumière des artères de résistance [284], ainsi qu'une fibrose périvasculaire myocardique [305]. Dans la présente étude, en concordance avec l'absence de remodelage cardiaque, l'aire de la lumière n'est pas diminuée et l'épaisseur des artères intramyocardiques n'est pas augmentée chez les rats ayant reçu la diète riche en gras. Toutefois, une réponse fibrotique a été démontrée au niveau périartériolaire chez nos rats hypertendus à l'aide de la coloration au Rouge Sirius. Cette fibrose peut être le résultat d'une accumulation des cellules inflammatoires au niveau sous-endothéliale, suite à leur attachement aux molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. L'expression de ces molécules d'adhésion peut être la conséquence d'une diminution de la biodisponibilité du facteur anti-inflammatoire NO [306, 307], suite à l'augmentation de l'hormone pro-inflammatoire Ang II [308]. De fait, l'Ang II est un puissant activateur de la

NAD(P)H oxydase [201, 309], soit la principale enzyme prooxydante vasculaire. Ainsi, l'augmentation de la concentration plasmatique du peptide combinée à celle de l'expression de l'oxydase chez les sujets hypertendus peut être à l'origine de la surproduction d'espèces réactives oxygénées vasculaires [310]. L'augmentation de cette production d'anions superoxyde entraîne un impact négatif sur la biodisponibilité du NO, neutralisant directement ce facteur relaxant [206]. Également, l'interaction de ces deux molécules génère le peroxyde nitrite, soit une espèce réactive oxygénée impliquée dans le découplage fonctionnel de la eNOS; l'altération subséquente de son activité est responsable de la synthèse de l'anion superoxyde au détriment de celle du NO [4]. Ainsi, l'action anti-inflammatoire induite par la présence du NO est réduite, favorisant l'attachement des cellules inflammatoires ainsi que la libération subséquente des facteurs de croissance impliqués dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Ces altérations se soldent par la production subséquente de collagène et la formation de fibrose périvasculaire [291].

Toutefois, des résultats additionnels ont suggéré une dissociation entre les deux mécanismes proposés ci-haut pour notre modèle de rat hypertendu. La présence de fibrose périvasculaire intramyocardique a été confirmée dans le cœur des rats normotendus traités au RES conjointement à la diète riche en gras. De plus, la production/ biodisponibilité du NO était préservée voire augmentée chez ces animaux tel que démontré par la potentialisation des relaxations aortiques dépendantes de l'endothélium, suggérant une absence d'espèces réactives oxygénées. Ainsi, la présence d'un ou des mécanisme(s) connexe(s) à l'hypertension artérielle et à la dysfonction endothéliale est implicite dans ce modèle pour expliquer le développement de la fibrose périvasculaire, tant au niveau du ventricule gauche que droit. Également, ces résultats obtenus démontrent une absence de potentiel antifibrotique du RES administré de manière chronique, tel que démontré dans de nombreuses études [402, 426]. En effet, ces dernières attestaient de sa capacité à limiter la prolifération des fibroblastes et leur différenciation induite par TGF- $\beta$ 3 [426], ainsi que l'augmentation de l'ARNm de TGF- $\beta$ 1 d'une manière dépendante de la concentration [402].

Une hypothèse possible serait que la réponse fibrotique périvasculaire soit la conséquence d'une réaction inflammatoire locale provoquée par une accumulation

vasculaire des lipides, malgré l'absence de dyslipidémie plasmatique significative. Par la suite, divers facteurs tels l'angiotensine II, l'endothéline-1 et les facteurs de croissance de transformation pourraient être régulés à la hausse et être impliqués dans la différenciation en myofibroblastes des fibroblastes locaux et des monocytes dérivées de la moelle osseuse [480]. Une avenue intéressante serait donc d'explorer ces diverses possibilités expliquant la présence de la fibrose périvasculaire intramyocardique chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras et le traitement au RES. La coloration *Oil Red O* ou au tétrahydroxyde d'osmium permettrait en premier lieu de déterminer si l'accumulation lipidique (acides gras et leurs dérivés) est présente au niveau périvasculaire. Ensuite, malgré le fait que nous avons démontré que les niveaux ventriculaires de TGF $\beta$ 3 et de TGF $\beta$ 1 étaient inchangés suite au traitement chronique avec le RES, il serait toutefois intéressant d'explorer leur expression locale à l'aide d'une technique d'immunofluorescence. Une élévation périvasculaire pourrait en effet être présente mais en quantité trop faible pour être détectée dans le ventricule entier.

En troisième lieu, Endo et al. ont démontré dans un modèle de cerclage aortique que la fibrose périvasculaire n'était pas exclusivement la conséquence de la migration des cellules inflammatoires mais impliquait également un bassin de cellules souches dérivées de la moelle osseuse [480]. Ces monocytes dérivés de la moelle osseuse migreraient au niveau périvasculaire pour ensuite se différencier en myofibroblastes. Afin de déterminer la participation possible de ce mécanisme dans notre modèle, l'administration de la diète riche en gras et du RES chronique pourrait être débutée suite à l'irradiation de la moelle osseuse chez les rats femelles. L'injection de monocytes dérivés de la moelle osseuse marqués au GFP permettrait de déterminer la contribution relative de ces cellules à la formation de la fibrose périvasculaire. Finalement, l'hyperinnervation sympathique démontrée dans la deuxième étude peut être à la source de la fibrose périvasculaire. Nattel et ses collègues ont démontré dans le cœur de patients épileptiques qu'une fibrose périvasculaire cardiaque était détectée, et que cette dernière serait le résultat d'une libération de catécholamines des fibres nerveuses sympathiques [481]. De plus, chez les rats spontanément hypertendus matures, l'inhibition du système sympatho-adrénal par l'injection de rilmenidine abolit la fibrose périvasculaire associée aux vaisseaux intramyocardiques; cette action était partiellement mais non exclusivement dépendante d'une diminution de la pression artérielle [482]. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer dans un premier temps le statut sympathique

cardiaque à l'aide de la technique d'immunofluorescence (GAP43 et TH) chez les rats ayant reçu la diète riche en gras et le traitement chronique de RES. Par la suite, une injection de rilmenidine permettrait de déterminer le lien potentiel entre l'hyperinnervation sympathique (si présente) et la fibrose périvasculaire intracardiaque.

L'hypertension artérielle et la dysfonction endothéliale peuvent également être à la source d'atteintes vasculaires systémiques, incluant l'athérosclérose. Tout comme pour la fibrose périvasculaire intramyocardique, la coloration *Oil Red O* ou tétroxyde d'osmium pourrait être réalisée au niveau de la crosse aortique afin de déterminer si l'accumulation lipidique est présente au niveau systémique. Par la suite, la coloration au trichrome de Masson pourrait renseigner sur l'infiltration aortique potentielle des cellules inflammatoires chez les rats ayant reçu la diète riche en gras. L'expression des molécules d'adhésion endothéliales des cellules inflammatoires, incluant ICAM-1 et VCAM-1, pourrait également être évaluée afin de renseigner sur l'attachement et la migration des cellules inflammatoires. Par ces techniques, il serait ainsi possible de déterminer si l'administration d'une diète riche en gras, malgré l'absence de modification du profil lipidique, est à la source de l'initiation du développement de l'athérosclérose.

**Remodelage cicatriciel et cardiaque post ischémie-reperfusion.** Il est établi que la production d'espèces réactives oxygénées est significativement augmentée suite à un infarctus du myocarde, tant au niveau des modèles expérimentaux que chez l'homme [483-485]. De plus, le stress oxydant est augmenté dans les modèles expérimentaux soumis à une insulte d'ischémie-reperfusion, où la reperfusion représente le plus puissant stimulus pour la production d'espèces réactives oxygénées [486]. L'implication de ces molécules dans les mécanismes cellulaires sous-jacents aux changements structurels et fonctionnels post-infarctus du myocarde est considérable. À titre d'exemple, les espèces réactives oxygénées stimulent la prolifération des fibroblastes et la synthèse du collagène, en plus d'activer les métalloprotéinases de la matrice [487-489]. Plusieurs des stimuli patho-physiologiques qui régulent la fibrose interstitielle et le renouvellement de la matrice, telles que l'Ang II et les cytokines [246], favorisent également la production des espèces réactives oxygénées. Des niveaux locaux d'Ang II sont augmentés au site infarci [490, 491] et l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou un antagoniste de AT<sub>1</sub> réduit le

stress oxydant, l'amincissement de la paroi de l'infarctus, la fibrose ainsi que la dilatation du ventricule gauche chez les modèles expérimentaux et chez les humains [492-495]. Plus directement, l'administration de l'antioxydant probucol améliore la fonction du ventricule gauche, prévient sa dilatation ainsi que l'hypertrophie de la paroi, et diminue la fibrose interstitielle suite à un infarctus du myocarde chez le rat [496].

Chez les gens obèses, de nombreuses études suggèrent que le remodelage cardiaque post-infarctus est inadapté comparativement aux gens de poids normal; ceci expliquerait l'augmentation du nombre de récurrence ainsi que de mortalité [350, 351]. De nombreuses études expérimentales ont également démontré que l'imposition d'une insulte d'ischémie-reperfusion chez les modèles obèses mène à une expansion et un amincissement de la cicatrice, combiné à une altération de la composition fibrotique [355-358]. Ceci pourrait être en partie attribué à une exacerbation de la production des espèces réactives oxygénées post-insulte dû à la présence concomitante de pathologies associées à l'obésité, incluant la maladie vasculaire associée au diabète de type 2, l'hypertension et l'athérosclérose. De fait, cette génération accrue potentialiserait leurs actions néfastes au niveau du remodelage cicatriciel et cardiaque.

Dans la présente étude, chez les deux groupes soumis à l'insulte d'ischémie-reperfusion, la cicatrice était petite et non transmurale. Cette observation peut être expliquée par la spécificité des genres puisque les femelles pré-ménopausées sont plus résistantes à l'insulte ischémique que les mâles, attesté par la présence d'une plus petite cicatrice [470, 497]. De plus, la composition (collagène  $\alpha_1$  de type 1), la taille et l'épaisseur de la cicatrice étaient comparables chez les rats ayant reçu la diète standard et riche en gras. La combinaison de tous ces résultats portant sur la cicatrice confirme donc le fait que l'état hypertendu chez les rats ayant reçu la diète riche en gras ne prédispose pas à une expansion de la taille de la cicatrice [498-500]. De plus, le stress oxydant ne semble porter aucune atteinte néfaste significative, suggérant que les niveaux d'espèces activées n'étaient pas suffisamment élevés au niveau cardiaque ou que des mécanismes compensateurs, tel l'estrogène, sont entrés en jeu afin de contrebalancer les mécanismes de détérioration de la cicatrice. Ainsi, l'absence de changement du remodelage cicatriciel entre les deux groupes pourrait également s'expliquer par l'absence d'impact négatif de la diète [5, 352-354] ou

d'altérations métaboliques chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras. En effet, l'absence d'obésité, de dyslipidémie et d'atteinte de la glycémie pourraient expliquer la préservation de la réponse fibrotique cicatricielle chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras [5, 356].

La cicatrisation inadéquate représente un mécanisme contribuant à la dilatation ventriculaire et au remodelage subséquent indésirable [356, 501]. Une cicatrice de grande taille et transmurale peut induire des altérations dans la topographie des régions infarctée et non-infarctée du ventricule, menant à une atteinte de la fonction cardiaque et du pronostic de survie [502]. Chez les 2 groupes ayant été soumis à l'insulte d'ischémie-reperfusion, le développement d'une hypertrophie cardiaque compensatoire n'est pas survenu, attesté par la similitude du ratio masse ventriculaire gauche/masse cardiaque et du contenu interstitiel en collagène  $\alpha 1$  type 1. Cette absence de remodelage est donc en concordance avec la présence d'une cicatrice de petite taille.

**Phénotype arythmogénique.** L'imposition d'une occlusion permanente a conduit à une augmentation significative du taux de mortalité chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras. Par la suite, l'application d'une ischémie temporaire (45 minutes d'ischémie, une semaine de reperfusion) a reproduit ces données, puisqu'une augmentation significative de la mortalité était encore détectée. Puisque les études morphologiques et histologiques ont démontré que la réponse cardiaque fibrotique et hypertrophique était adaptée chez les animaux ayant reçu une diète riche en gras, l'hypothèse de la rupture de la cicatrice ou d'une insuffisance cardiaque terminale a ainsi été rejetée comme source de décès. De plus, le fait que les animaux soient décédés au cours des premières 24 heures infirme ces deux causes de décès puisque cette période est trop courte pour la formation d'une cicatrice ou l'établissement d'une insuffisance cardiaque. De nombreuses études ont démontré que chez les patients obèses ayant subi un infarctus, le risque d'arythmies cardiaques et de mort subite est supérieur [386, 387]. De plus, la prévalence accrue de ces causes de décès est également documentée chez les patients obèses présentant une fonction contractile normale [386]. Les mécanismes arythmogéniques potentiels liés à l'obésité incluent la prolongation de l'intervalle QT<sub>c</sub> et l'augmentation de l'activité sympathique [386, 503, 504]. Dans un premier temps, afin d'évaluer la susceptibilité aux arythmies cardiaques dans notre modèle

animal sans obésité, l'analyse du tracé d'ECG a été réalisée au cours de l'ischémie et de la reperfusion. Les résultats démontrent une augmentation significative de la proportion des animaux présentant une arythmie ainsi qu'une plus grande précocité dans l'apparition de ces événements comparativement aux animaux ayant reçu une diète standard. Dans un deuxième temps, les études électrophysiologiques ont confirmé que la prévalence des arythmies cardiaques était augmentée suite à une stimulation électrique malgré l'absence d'un gain significatif de la masse corporelle, de dyslipidémie et d'hyperglycémie.

Dans un modèle canin de tachystimulation, l'augmentation de la susceptibilité et de la durée de la fibrillation auriculaire était expliquée par une augmentation du temps de recouvrement sinusal combinée à une diminution de la période réfractaire efficace auriculaire [505]. Dans la présente étude, l'administration de la diète riche en gras n'a eu aucun effet sur la durée ou la fréquence de la fibrillation auriculaire, tel qu'appuyé par la préservation du temps de recouvrement sinusal (SNRT) ainsi que par l'absence de variation de la période réfractaire efficace auriculaire comparativement aux animaux ayant reçu la diète standard (résultats non présentés). De plus, l'évaluation du point de Wenckebach atteste que la transmission de l'influx au niveau du nœud atrio-ventriculaire est conservée puisque les valeurs des animaux ayant reçu la diète riche en gras ( $145 \pm 6$  msec) sont similaires à ceux des animaux ayant reçu la diète standard ( $154 \pm 17$  msec). Dans un premier temps, les résultats de SNRT et de point de Wenckebach démontrent que l'administration de la diète riche en gras ne porte aucune atteinte aux tissus nodaux, préservant l'intégrité et la fonctionnalité de ces derniers. Dans un deuxième temps, l'absence de variation des périodes réfractaires effectives auriculaires chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras suggère une préservation de la cinétique d'activation des canaux ioniques supra-ventriculaires. En dernier lieu, l'absence de différence du nombre d'extrasystoles auriculaires et de la fréquence/durée de la fibrillation auriculaire suite aux extra-stimulations témoigne que la susceptibilité aux arythmies auriculaires n'est pas augmentée suite à l'administration de la diète riche en gras.

Les expériences avec imposition d'une salve rapide de stimulations (*burst*) ont démontré que le nombre et la durée moyenne des tachycardies auriculaires et ventriculaires étaient comparables chez les deux groupes. Par contre, malgré ces derniers résultats et la

préservation de la période réfractaire efficace ventriculaire, les animaux ayant reçu la diète riche en gras présentaient davantage ( $p < 0,05$ ) d'épisodes de tachycardie ventriculaire suite à l'imposition d'extra-stimulations. Ces résultats suggèrent ainsi que la prédisposition aux arythmies de type réentrée est augmentée chez les animaux qui ont reçu la diète riche en gras, malgré l'absence d'une obésité établie. La fibrose myocardique représente un mécanisme expliquant la survenue d'arythmies [506, 507]. L'utilisation de la coloration au Rouge Sirius a toutefois démontré que le contenu ventriculaire en collagène  $\alpha 1$  de type 1 n'était pas significativement augmenté chez les animaux présentant le phénotype arythmogénique. Ainsi, la susceptibilité accrue aux altérations du rythme n'est pas associée à un environnement fibrotique établi.

**Remodelage neuronal.** Plusieurs évidences chez les patients et dans les modèles expérimentaux supportent le fait que l'hypertension artérielle associée à l'obésité est reliée à une augmentation de l'activité nerveuse sympathique [503, 504, 508]. Par contre, il demeure incertain si l'augmentation de l'activité sympathique dans le développement de l'obésité est reliée en partie à l'augmentation de l'innervation sympathique. La germination des fibres sympathiques a été reportée dans le cœur infarcté et identifiée comme étant un événement initiateur de l'arythmie cardiaque et de la mort subite [258, 370, 509, 510]. Ainsi, ces observations ont justifié l'évaluation de l'innervation sympathique chez les animaux ayant une prédisposition accrue aux arythmies ventriculaires et au décès. L'élévation de la densité des fibres neurofilament-M immunoréactives a en effet été établie chez les animaux ayant reçu une diète riche en gras, confirmant une hyperinnervation sympathique. De plus, ces fibres sympathiques semblent matures puisqu'une augmentation de l'expression protéinique de l'hydroxylase de la tyrosine a conjointement été démontrée.

Plusieurs études ont démontré que le stress oxydant et l'inflammation jouent un rôle important dans le remodelage sympathique ventriculaire chez les lapins présentant une hypercholestérolémie [251] et chez les rats avec infarctus du myocarde [252], ainsi que dans le remodelage sympathique auriculaire chez les chiens avec une tachy-stimulation [253]. Le stress oxydant [260] et l'inflammation [511] sont impliqués dans le dommage neuronal du système nerveux sympathique, induisant une dénervation. Ceci provoque la réexpression de NGF- $\beta$  et autres facteurs neurotrophiques au niveau du site atteint, menant à

la régénération par la germination des fibres [512]. De plus, le stress oxydant et les principales cytokines pro-inflammatoires peuvent directement réguler à la hausse l'expression de NGF dans les cardiomyocytes ventriculaires puisqu'ils possèdent la capacité d'augmenter la sécrétion et de moduler l'expression des récepteurs de certains types cellulaires [513-515]. Dans la présente étude, les niveaux ventriculaires d'ARNm de NGF- $\beta$  n'étaient pas plus élevés chez les animaux qui présentaient une hyperinnervation sympathique. Toutefois, les tissus adipeux représentent une seconde source importante de sécrétion de NGF- $\beta$  et les niveaux de cette neurotrophine sont augmentés chez les gens obèses [516, 517]. Les concentrations plasmatiques de NGF- $\beta$  n'ont pas été quantifiées dans la présente étude mais la synthèse et libération accrues d'une telle source extracardiaque peut avoir contribué à l'hyperinnervation sympathique des rats ayant reçu la diète riche en gras. Outre l'implication de NGF- $\beta$ , l'hypercholestérolémie favorise également l'hyperinnervation sympathique et est associée à une augmentation de la vulnérabilité à la fibrillation ventriculaire [251]. Toutefois, l'augmentation du tonus sympathique des rats ayant reçu la diète riche en gras ne peut être attribuée à l'hypercholestérolémie puisque les niveaux plasmatiques de cholestérol sont normaux.

**Remodelage électrique.** Une perturbation de l'expression et/ou de la localisation des Cx43 contribue à la génération d'un substrat arythmogénique, tel que démontré chez l'homme et dans plusieurs modèles expérimentaux [518, 519]. En effet, l'analyse des tissus myocardiques infarctés humains a démontré une diminution et délocalisation des jonctions intercellulaires; ce substrat pathologique corrélait avec la localisation des circuits de réentrée en bordure de la zone infarctée [371]. Également, chez les souris déficientes en Cx43 myocardique, la conduction est significativement réduite et facilite les arythmies de réentrée et la mort subite [383, 520]. Dans la présente étude, la localisation de la Cx43 totale était altérée chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras : l'immunoréactivité était détectée sur la membrane latérale de nombreux myocytes ventriculaires alors qu'elle était exclusivement localisée dans les disques intercalaires chez les animaux ayant reçu la diète standard. Cette latéralisation n'était pas combinée à une diminution de son expression mais bien à une augmentation. En effet, une élévation du contenu protéinique a été détectée

chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras et ceci pourrait être la conséquence d'une augmentation de sa synthèse et/ou une diminution de la dégradation.

Une étude réalisée par Dodge et ses collègues au niveau des myocytes ventriculaires isolés de rats néonataux démontre qu'une exposition à l'Ang II mène à une élévation de l'expression protéinique de Cx43 totale, augmentant ainsi le nombre et la taille des jonctions intercellulaires [521]. L'incubation avec l'AMPc (le second messager de la norépinéphrine dérivée du système nerveux sympathique [49]) mène également à une augmentation du contenu protéinique en Cx43 totale. Toutefois, contrairement à l'Ang II, l'augmentation de la synthèse n'est pas démontrée suite à la stimulation avec l'AMPc, suggérant plutôt un mécanisme de diminution de la dégradation [521]. La stimulation du système nerveux sympathique au cours d'un infarctus du myocarde aigu diminue significativement l'expression de la Cx43 phosphorylée chez le rat [522]. Puisque la phosphorylation représente un événement de régulation impliqué dans l'internalisation et la dégradation des jonctions intercellulaires (par les protéasomes [523, 524] et les lysosomes [525, 526]), ces données suggèrent en effet une diminution de la dégradation. L'implication de l'AMPc dans la dégradation des Cx43 est également démontrée chez le rat soumis à une ischémie, puisqu'une stimulation du nerf vague parasympathique prévient la perte de la phosphorylation de Cx43, améliorant ainsi la stabilité électrique induite par l'insulte [527].

Dans la présente étude, les deux mécanismes suggérés ci-haut peuvent être impliqués dans l'altération de l'expression de la Cx43. En effet, l'Ang II est un médiateur important dans le maintien et le développement de l'hypertension [280], rendant l'hypothèse d'augmentation de la synthèse plausible chez les rats ayant reçu la diète riche en gras. De plus, puisque les niveaux protéiniques de la Cx43 phosphorylée (Ser<sup>368</sup>) étaient significativement réduits, l'hypothèse la diminution de la dégradation est avancée et pourrait être la conséquence de l'hyperinnervation sympathique cardiaque. Somme toute, ces altérations au niveau de l'expression et de la localisation pourraient en partie expliquer l'augmentation de la susceptibilité des arythmies ventriculaires comparativement aux animaux ayant reçu la diète standard, tel que prouvé dans de nombreuses études.

En dernier lieu, l'implication du stress oxydant dans la modulation de l'expression des Cx43 est nébuleuse. De fait, quelques études seulement ont cherché à comprendre le lien

potentiel entre la phosphorylation et l'augmentation de la présence des espèces réactives oxygénées. Au niveau hépatique, les traitements antioxydants ont prévenu l'augmentation de la dégradation de la Cx32 induite par le peroxyde d'hydrogène, améliorant ainsi la communication intercellulaire entre hépatocytes [528, 529]. Au niveau oculaire, le peroxyde d'hydrogène est toutefois à l'origine d'une diminution de la dégradation, tel qu'appuyé par une augmentation de la phosphorylation de la Cx46 [530]. De plus, puisque de nombreuses divergences existent entre les diverses connexines au niveau de la localisation, du temps de demi-vie et de la phosphorylation (présence requise ou non, sites, kinases impliquées) [42], l'extrapolation à la Cx43 est risquée. Une étude réalisée par Rakotovo et ses collègues a par contre démontré qu'une administration d'une forte concentration de l'antioxydant sélénium prévenait l'augmentation de l'expression de la Cx43 totale induite par l'insulte d'ischémie-reperfusion [531]. Ceci suggère que la présence des espèces réactives oxygénées est à la source d'une augmentation de la synthèse ou d'une diminution de la dégradation de la Cx43. Ainsi, dans la présente étude, il se pourrait que les espèces réactives oxygénées soit également impliquées, et même qu'elles représentent un des composés empruntés par l'Ang II pour exercer son effet sur l'expression des connexines.

**Avenues futures.** Lorsqu'un patient présente les manifestations cliniques du présent modèle, soit un indice de masse corporelle, une glycémie et un profil lipidique normal, les traitements de première ligne contre l'élévation modeste de la pression artérielle incluent l'augmentation de l'activité physique quotidienne, la cessation du tabagisme et la modification des choix alimentaires sans l'addition d'un traitement pharmacologique. Toutefois, la susceptibilité aux arythmies ventriculaires et le taux de décès subséquent chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras sont significativement élevés comparativement aux animaux ayant reçu la diète standard suite à une insulte ischémique. Ainsi, les mécanismes impliqués méritent d'être approfondis afin de pouvoir offrir une cible de traitement appropriée pour ces patients. Chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, les concentrations plasmatiques de norépinephrine sont significativement augmentées et le résultat clinique est relié à cette concentration. De plus, l'évaluation de l'activité sympathique globale (par micro-neurographie) et cardiaque (par la méthode du radiotracteur) atteste que la libération de norépinephrine peut être jusqu'à 50 fois plus

élevée chez les patients insuffisants au repos comparativement aux gens sains [532]. Esler et al. ont ainsi établi que l'activation du débit sympathique cardiaque contribue au développement d'arythmies et potentiellement à la progression de l'insuffisance cardiaque. Cette prémisse justifierait donc l'évaluation de ces paramètres chez les rats femelles ayant reçu une diète riche en gras.

Dans la présente étude, le phénotype arythmogénique ventriculaire est associé à une hyperinnervation sympathique chez les rats femelles ayant reçu la diète riche en gras, confirmé par l'augmentation de la densité des fibres neurofilament-M. De plus, cette élévation de la quantité semble associée à une augmentation de l'activité sympathique puisque l'expression protéinique de l'hydroxylase de la tyrosine est supérieure chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras, confirmant la fonctionnalité de ces fibres. Afin de confirmer cette maturité, une expérience d'immunofluorescence pourrait être réalisée avec un marquage contre la protéine PSA-NCAM, soit un marqueur des fibres sympathiques immatures. Par la suite, les niveaux de catécholamines circulants pourraient être mesurés afin de potentiellement établir une corrélation avec l'hyperinnervation sympathique fonctionnelle et l'augmentation du taux de décès. La découverte de tels marqueurs représenterait une étape importante pour l'application clinique puisque les conditions pathologiques de notre modèle ne constituent pas une situation où le clinicien va approfondir les investigations, malgré le phénotype arythmogénique.

Initialement, une hypothèse unique était émise pour la deuxième étude, soit que l'administration de la diète riche en gras était à l'origine d'un remodelage cardiaque et cicatriciel néfaste. Ainsi, les divers mécanismes altérés se devaient d'être explorés afin d'expliquer cette malformation cicatricielle. En fonction de ces objectifs, l'absence d'un traitement chronique avec le RES avait été sélectionnée pour trois raisons principales. Dans un premier temps, une étude réalisée par Burstein et ses collègues a évalué le potentiel du RES chronique au niveau du remodelage cardiaque suite à une insulte d'ischémie-reperfusion chez les rats femelles. L'administration de RES (17 mg·kg<sup>-1</sup>·j<sup>-1</sup> débutant 7 jours avant l'imposition de l'insulte et se poursuivant pour une période de 12 semaines) n'a pas prévenu la détérioration hémodynamique engendrée par l'I/R, ni amélioré les remodelages cardiaque et cicatriciel comparativement au groupe témoin [435]. Ainsi, puisque la diète

riche en gras n'est pas à l'origine de modifications néfastes de l'hémodynamie ou du remodelage cardiaque et cicatriciel chez les rats femelles (étant ainsi comparable aux animaux ayant reçu la diète standard), nous avons émis l'hypothèse que l'absence d'effets bénéfiques du RES serait également retrouvé dans notre modèle.

Dans un deuxième temps, un des effets bénéfiques apportés par le RES chronique dans la première étude est une diminution significative de la pression artérielle, tant chez les rats ayant reçu la diète standard et la diète riche en gras. Toutefois, puisqu'il est établi que l'état hypertendu ne prédispose pas à une expansion de la taille de la cicatrice [498-500], cette action bénéfique du RES aurait très probablement été associée à une absence d'effet cicatriciel suite à l'insulte d'ischémie-reperfusion chez les rats ayant reçu la diète riche en gras. Dans un dernier temps, alors que quelques études cliniques ont démontré une diminution significative de la pression artérielle suite à un traitement antioxydant [436], rares sont celles qui ont démontré une diminution significative de la mortalité cardiovasculaire [441]. Ainsi, puisque l'hyperinnervation sympathique ventriculaire était observée chez les rats ayant reçu la diète riche en gras, conjointement à une altération de l'expression des connexines et à augmentation de l'arythmie ventriculaire, le traitement bêtabloqueur aurait davantage été sélectionné.

De fait, il serait intéressant de déterminer l'impact d'un traitement préventif avec un bêta-bloqueur, tel le carvedilol. Ainsi, une semaine avant la fin de l'administration de la diète riche en gras et de l'imposition de l'insulte d'ischémie-reperfusion, un traitement au carvedilol ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  per os) pourrait être donné aux animaux [533]. De cette manière, il serait possible de déterminer si l'hyperinnervation sympathique joue un rôle déterminant dans le phénotype arythmogénique et dans l'augmentation du taux de décès chez les rats femelles ayant reçu la diète riche en gras [258, 370, 509, 510]. De plus, quelques études ont évalué l'impact de carvedilol sur l'expression et la distribution des connexines cardiaques telles Cx40 et Cx43. Ces dernières démontraient un impact positif sur les variations pathologiques induites dans un modèle d'infarctus du myocarde [533, 534] et de cardiomyopathie dilatée [535]. Entre autres, le traitement préventif de carvedilol diminuait le remodelage des Cx43 ventriculaires dans un modèle de rat d'I/R [534] et celui Cx40 dans les oreillettes de lapins suite à une ischémie permanente [533], possiblement suite à une diminution de l'influence du tonus sympathique [522, 527]. Ainsi, la démonstration d'une

implication néfaste de l'augmentation du tonus sympathique pourrait orienter vers l'utilisation des bêtabloqueurs comme traitement de première ligne de l'hypertension chez ces patients, aux dépens des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II et des diurétiques. Ainsi, en plus de contrôler la pression artérielle, ce traitement pourrait limiter les conséquences associées à l'hypertension, tel que les arythmies ventriculaires.

**Limitations de l'étude.** Les projets présentés comportent quelques limitations au niveau de l'expérimentation. Dans la présente étude, il a été spéculé que le stress oxydant était à l'origine de la dysfonction endothéliale. Ceci était fondé sur le fait que l'ajout *in vitro* de 0,1  $\mu$ M RES dans les cuves n'a pas amélioré les relaxations aortiques dépendantes de l'endothélium chez les animaux ayant reçu la diète standard suite à une stimulation à l'ACh, alors qu'il a potentialisé ces relaxations chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras. Toutefois, une mesure directe complémentaire aurait pu être réalisée afin de confirmer cette présence accrue d'espèces réactives oxygénées chez les animaux ayant reçu la diète riche en gras. Ainsi, les niveaux d'hydroperoxydes auraient pu être mesurés à l'aide d'un kit commercial ou les concentrations d'anions superoxyde à l'aide de la technique de chemoluminescence. De plus, la réalisation de ces expériences aurait pu apporter des précisions sur le(s) mécanisme(s) du RES au niveau de l'inhibition du développement de l'hypertension. En effet, puisque le RES possède diverses cibles, il est possible que son effet hypotenseur suite à l'administration chronique *in vivo* ne soit pas exclusivement la conséquence d'une diminution du stress oxydant.

L'implication du système nerveux sympathique a été suggérée dans la présente étude afin d'expliquer le phénotype arythmogénique chez les rats femelles ayant reçu la diète riche en gras. De fait, une hyperinnervation sympathique a été démontrée par la présence d'un signal immunofluorescent du neurofilament M qui était davantage prononcé comparativement aux animaux ayant reçu la diète standard. Cette protéine membranaire, localisée tant au niveau des neurones matures qu'immatures, atteste donc que la densité des fibres sympathiques est supérieure sans toutefois renseigner sur leur fonctionnalité. L'évaluation protéinique de l'hydroxylase de la tyrosine démontre une augmentation de son expression, suggérant une élévation du contenu ventriculaire en catécholamines et ainsi de leur action. Toutefois, un co-marquage aurait pu être réalisé afin de confirmer de manière

plus directe l'augmentation du tonus sympathique fonctionnel au niveau cardiaque. Ainsi, la localisation des neurofilaments M et du marqueur des neurones immatures, soit PSA-NCAM (forme polysialique des molécules d'adhésion des cellules neurales), aurait pu être obtenue afin de confirmer une hyperinnervation fonctionnelle ou de démontrer un rajeunissement neuronal (dépression fonctionnelle). De plus, la quantification des catécholamines aurait pu démontrer que l'augmentation de l'expression de l'enzyme TH est associée à une augmentation du contenu cellulaire en adrénaline et noradrénaline.

Dans la deuxième étude également, une augmentation des niveaux protéiniques de la Cx43 totale est démontrée, conjointement à une diminution de celle des Cx43 phosphorylées. Ces variations peuvent être la conséquence d'une élévation de la synthèse des Cx couplée à une diminution de leur dégradation. Tel que suggéré en présence d'une hypertrophie ventriculaire [381], il se peut que des variations temporelles soient présentes dans notre modèle. Ainsi, alors que l'élévation de la synthèse des Cx43 a été suggérée au moment du sacrifice, il est possible qu'une diminution de la synthèse aie été initiée, attestée par la réduction des niveaux d'ARNm. La détermination de cette valeur aurait ainsi permis d'élaborer sur les mécanismes d'expression des Cx. En dernier lieu, tel que mentionné dans la section du choix du modèle, il existe des différences entre les mâles et les femelles, dont l'effet cardioprotecteur de l'œstrogène. Toutefois, les cycles menstruels (d'une durée de 3 jours) n'ont pas été pris en considération dans la présente étude. Il aurait donc été intéressant de sacrifier les rats femelles à la même période du cycle afin d'éliminer ce biais potentiel.

**Conclusion.** La relation entre l'obésité et le développement de maladies cardiovasculaires est univoque, tant chez l'humain que dans divers modèles expérimentaux. Dans la présente étude, avant l'établissement d'obésité et de dyslipidémie, les rats femelles modestement hypertendus présentent une réponse fibrotique augmentée au niveau périvasculaire myocardique alors que cette réponse est préservée au niveau cicatriciel suite à un épisode d'ischémie-reperfusion. Un phénotype arythmogénique cardiaque est également démontré chez les rats ayant reçu la diète riche en gras, en partie dû à une hyperinnervation sympathique et à une expression altérée concomitante de la distribution et de l'expression des jonctions intercellulaires. L'absence de symptômes cliniques d'obésité dans la présente

étude ne fourni aucun indice au clinicien quant à la susceptibilité accrue aux arythmies ventriculaires. Ainsi, en présence d'une hypertension artérielle modérée chez un patient non-obèse, la mesure de l'activité sympathique cardiaque pourrait être bénéfique afin de détecter les patients à risque de mort subite.

## REFERENCES

---

1. Hedley, A.A., et al., *Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002*. *Jama*, 2004. **291**(23): p. 2847-50.
2. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement*. *Curr Opin Cardiol*, 2006. **21**(1): p. 1-6.
3. Dobrian, A.D., et al., *Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity*. *Hypertension*, 2000. **35**(4): p. 1009-15.
4. Dobrian, A.D., et al., *Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension*. *Hypertension*, 2001. **37**(2 Part 2): p. 554-60.
5. du Toit, E.F., et al., *Myocardial susceptibility to ischemic-reperfusion injury in a prediabetic model of dietary-induced obesity*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(5): p. H2336-43.
6. Pathak, A., et al., *[Study of ventricular repolarization in an experimental model of arterial hypertension associated with obesity]*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2002. **95**(7-8): p. 651-5.
7. Vary, T.C., D.K. Reibel, and J.R. Neely, *Control of energy metabolism of heart muscle*. *Annu Rev Physiol*, 1981. **43**: p. 419-30.
8. Schultz, S.G. and P.F. Curran, *Coupled transport of sodium and organic solutes*. *Physiol Rev*, 1970. **50**(4): p. 637-718.
9. Gotto, A.M., Jr., *Interrelationship of triglycerides with lipoproteins and high-density lipoproteins*. *Am J Cardiol*, 1990. **66**(6): p. 20A-23A.
10. Tso, P., *Gastrointestinal digestion and absorption of lipid*. *Adv Lipid Res*, 1985. **21**: p. 143-86.
11. Bragdon, J.H., *Chylomicrons and lipid transport*. *Ann N Y Acad Sci*, 1959. **72**: p. 845-50.
12. Breckenridge, W.C., *The catabolism of very low density lipoproteins*. *Can J Biochem Cell Biol*, 1985. **63**(8): p. 890-7.
13. McGarry, J.D. and D.W. Foster, *Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production*. *Annu Rev Biochem*, 1980. **49**: p. 395-420.
14. McGarry, J.D., et al., *Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase*. *Diabetes Metab Rev*, 1989. **5**(3): p. 271-84.
15. Fritz, I.B. and K.T. Yue, *Long-Chain Carnitine Acyltransferase and the Role of Acylcarnitine Derivatives in the Catalytic Increase of Fatty Acid Oxidation Induced by Carnitine*. *J Lipid Res*, 1963. **4**: p. 279-88.
16. James, D.E., M. Strube, and M. Mueckler, *Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter*. *Nature*, 1989. **338**(6210): p. 83-7.
17. Abel, E.D., *Glucose transport in the heart*. *Front Biosci*, 2004. **9**: p. 201-15.
18. Fisher, R.B. and J.R. Williamson, *The effects of insulin, adrenaline and nutrients on the oxygen uptake of the perfused rat heart*. *J Physiol*, 1961. **158**: p. 102-12.
19. Messer, J.V., et al., *Patterns of human myocardial oxygen extraction during rest and exercise*. *J Clin Invest*, 1962. **41**: p. 725-42.
20. Oskarsson, G., *Coronary flow and flow reserve in children*. *Acta Paediatr Suppl*, 2004. **93**(446): p. 20-5.

21. Randle, P.J., et al., *Mechanisms modifying glucose oxidation in diabetes mellitus*. Diabetologia, 1994. **37 Suppl 2**: p. S155-61.
22. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1(7285)**: p. 785-9.
23. Abozguia, K., et al., *Modification of myocardial substrate use as a therapy for heart failure*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3(9)**: p. 490-8.
24. Berger, J. and D.E. Moller, *The mechanisms of action of PPARs*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 409-35.
25. Huss, J.M. and D.P. Kelly, *Nuclear receptor signaling and cardiac energetics*. Circ Res, 2004. **95(6)**: p. 568-78.
26. Moller, D.E., *New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome*. Nature, 2001. **414(6865)**: p. 821-7.
27. Leone, T.C., C.J. Weinheimer, and D.P. Kelly, *A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96(13)**: p. 7473-8.
28. Cheng, L., et al., *Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy*. Nat Med, 2004. **10(11)**: p. 1245-50.
29. Lopaschuk, G.D., et al., *Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1213(3)**: p. 263-76.
30. Kudo, N., et al., *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, 1995. **270(29)**: p. 17513-20.
31. King, K.L., et al., *Regulation of cardiac malonyl-CoA content and fatty acid oxidation during increased cardiac power*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289(3)**: p. H1033-7.
32. Lazar, H.L., *Alterations in myocardial metabolism in the diabetic myocardium*. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **18(4)**: p. 289-92.
33. Eckel, J. and H. Reinauer, *Insulin action on glucose transport in isolated cardiac myocytes: signalling pathways and diabetes-induced alterations*. Biochem Soc Trans, 1990. **18(6)**: p. 1125-7.
34. Halseth, A.E., D.P. Bracy, and D.H. Wasserman, *Overexpression of hexokinase II increases insulin and exercise-stimulated muscle glucose uptake in vivo*. Am J Physiol, 1999. **276(1 Pt 1)**: p. E70-7.
35. Barry, W.H. and J.H. Bridge, *Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes*. Circulation, 1993. **87(6)**: p. 1806-15.
36. Stern, M.D., *Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle*. Biophys J, 1992. **63(2)**: p. 497-517.
37. Tribulova, N., et al., *Myocardial gap junctions: targets for novel approaches in the prevention of life-threatening cardiac arrhythmias*. Physiol Res, 2008. **57 Suppl 2**: p. S1-S13.
38. Dhein, S., *Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation*. Trends Pharmacol Sci, 1998. **19(6)**: p. 229-41.
39. Laird, D.W., *The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation*. J Bioenerg Biomembr, 1996. **28(4)**: p. 311-8.

40. Crow, D.S., et al., *Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(4): p. 1754-63.
41. Kanemitsu, M.Y., et al., *Tyrosine phosphorylation of connexin 43 by v-Src is mediated by SH2 and SH3 domain interactions*. J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22824-31.
42. Lampe, P.D. and A.F. Lau, *Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins*. Arch Biochem Biophys, 2000. **384**(2): p. 205-15.
43. Lampe, P.D. and A.F. Lau, *The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(7): p. 1171-86.
44. Lau, A.F., et al., *Regulation of connexin43 function by activated tyrosine protein kinases*. J Bioenerg Biomembr, 1996. **28**(4): p. 359-68.
45. Salameh, A. and S. Dhein, *Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer?* Biochim Biophys Acta, 2005. **1719**(1-2): p. 36-58.
46. Laird, D.W., *Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1711**(2): p. 172-82.
47. Musil, L.S. and D.A. Goodenough, *Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques*. J Cell Biol, 1991. **115**(5): p. 1357-74.
48. Laing, J.G., et al., *Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome*. Exp Cell Res, 1997. **236**(2): p. 482-92.
49. Raymond, J.R., et al., *Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes*. Hypertension, 1990. **15**(2): p. 119-31.
50. Brodde, O.E., M.C. Michel, and H.R. Zerkowski, *Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure*. Cardiovasc Res, 1995. **30**(4): p. 570-84.
51. Kaumann, A.J. and P. Molenaar, *Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997. **355**(6): p. 667-81.
52. Bristow, M.R., *Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(4 Suppl A): p. 61A-71A.
53. Bristow, M.R., et al., *Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium*. Circulation, 1990. **82**(2 Suppl): p. I12-25.
54. Levy, M.N., *Role of calcium in arrhythmogenesis*. Circulation, 1989. **80**(6 Suppl): p. IV23-30.
55. Talano, J.V., et al., *Sinus node dysfunction. An overview with emphasis on autonomic and pharmacologic consideration*. Am J Med, 1978. **64**(5): p. 773-81.
56. DiFrancesco, D. and C. Tromba, *Acetylcholine inhibits activation of the cardiac hyperpolarizing-activated current, if*. Pflugers Arch, 1987. **410**(1-2): p. 139-42.
57. DiFrancesco, D. and C. Tromba, *Muscarinic control of the hyperpolarization-activated current (if) in rabbit sino-atrial node myocytes*. J Physiol, 1988. **405**: p. 493-510.
58. Dhein, S., C.J. van Koppen, and O.E. Brodde, *Muscarinic receptors in the mammalian heart*. Pharmacol Res, 2001. **44**(3): p. 161-82.
59. Hove-Madsen, L., et al., *Regulation of myocardial calcium channels by cyclic AMP metabolism*. Basic Res Cardiol, 1996. **91 Suppl 2**: p. 1-8.

60. Han, X., et al., *Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca<sup>2+</sup> current in adult rabbit atrioventricular nodal cells*. *Circ Res*, 1996. **78**(6): p. 998-1008.
61. Fabiato, A., *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum*. *Am J Physiol*, 1983. **245**(1): p. C1-14.
62. Bassani, J.W., W. Yuan, and D.M. Bers, *Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(5 Pt 1): p. C1313-9.
63. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. *Nature*, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
64. Wier, W.G. and C.W. Balke, *Ca(2+) release mechanisms, Ca(2+) sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle*. *Circ Res*, 1999. **85**(9): p. 770-6.
65. Brenner, B., *Effect of Ca<sup>2+</sup> on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(9): p. 3265-9.
66. Noble, D., et al., *The role of sodium-calcium exchange during the cardiac action potential*. *Ann N Y Acad Sci*, 1991. **639**: p. 334-53.
67. Trafford, A.W., et al., *Comparison of subsarcolemmal and bulk calcium concentration during spontaneous calcium release in rat ventricular myocytes*. *J Physiol*, 1995. **488** ( Pt 3): p. 577-86.
68. Brette, F. and C. Orchard, *T-tubule function in mammalian cardiac myocytes*. *Circ Res*, 2003. **92**(11): p. 1182-92.
69. Jacob, R. and G. Kissling, *Ventricular pressure-volume relations as the primary basis for evaluation of cardiac mechanics. Return to Frank's diagram*. *Basic Res Cardiol*, 1989. **84**(3): p. 227-46.
70. Brutsaert, D.L., V.A. Claes, and E.H. Sonnenblick, *Velocity of shortening of unloaded heart muscle and the length-tension relation*. *Circ Res*, 1971. **29**(1): p. 63-75.
71. Chien, K.R., et al., *Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response*. *Faseb J*, 1991. **5**(15): p. 3037-46.
72. Rupp, H., *Differential effect of physical exercise routines on ventricular myosin and peripheral catecholamine stores in normotensive and spontaneously hypertensive rats*. *Circ Res*, 1989. **65**(2): p. 370-7.
73. Rupp, H., et al., *Modulation of myosin isoenzyme populations and activities of monoamine oxidase and phenylethanolamine-N-methyltransferase in pressure loaded and normal rat heart by swimming exercise and stress arising from electrostimulation in pairs*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1984. **62**(9): p. 1209-18.
74. Rupp, H. and R. Jacob, *Response of blood pressure and cardiac myosin polymorphism to swimming training in the spontaneously hypertensive rat*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1982. **60**(8): p. 1098-103.
75. Scheuer, J., et al., *Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats*. *J Clin Invest*, 1982. **70**(6): p. 1300-5.
76. Lee, F.A., *Hemodynamics of the right ventricle in normal and disease states*. *Cardiol Clin*, 1992. **10**(1): p. 59-67.
77. Dell'Italia, L.J., *The right ventricle: anatomy, physiology, and clinical importance*. *Curr Probl Cardiol*, 1991. **16**(10): p. 653-720.

78. Haddad, F., et al., *Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle*. Circulation, 2008. **117**(11): p. 1436-48.
79. Zinemanas, D., R. Beyar, and S. Sideman, *Effects of myocardial contraction on coronary blood flow: an integrated model*. Ann Biomed Eng, 1994. **22**(6): p. 638-52.
80. Kinch, J.W. and T.J. Ryan, *Right ventricular infarction*. N Engl J Med, 1994. **330**(17): p. 1211-7.
81. Farb, A., A.P. Burke, and R. Virmani, *Anatomy and pathology of the right ventricle (including acquired tricuspid and pulmonic valve disease)*. Cardiol Clin, 1992. **10**(1): p. 1-21.
82. Gold, F.L. and R.J. Bache, *Transmural right ventricular blood flow during acute pulmonary artery hypertension in the sedated dog. Evidence for subendocardial ischemia despite residual vasodilator reserve*. Circ Res, 1982. **51**(2): p. 196-204.
83. Tillmanns, H., et al., *Pressure measurements in the terminal vascular bed of the epimyocardium of rats and cats*. Circ Res, 1981. **49**(5): p. 1202-11.
84. Floyd, W.F. and E. Neil, *The influence of the sympathetic innervation of the carotid bifurcation on chemoceptor and baroreceptor activity in the cat*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1952. **91**(1-2): p. 230-39.
85. Chan, R.K., E.V. Jarvina, and P.E. Sawchenko, *Effects of selective sinoaortic denervations on phenylephrine-induced activational responses in the nucleus of the solitary tract*. Neuroscience, 2000. **101**(1): p. 165-78.
86. Akemi Sato, M., et al., *Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2001. **38**(3 Pt 2): p. 560-4.
87. Pilowsky, P.M. and A.K. Goodchild, *Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on*. J Hypertens, 2002. **20**(9): p. 1675-88.
88. Chalmers, J., et al., *Central neurons and neurotransmitters in the control of blood pressure*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1994. **21**(10): p. 819-29.
89. McCubbin, J.W., J.H. Green, and I.H. Page, *Baroreceptor function in chronic renal hypertension*. Circ Res, 1956. **4**(2): p. 205-10.
90. Cowley, A.W., Jr., J.F. Liard, and A.C. Guyton, *Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs*. Circ Res, 1973. **32**(5): p. 564-76.
91. Guyton, A.C., et al., *Blood pressure regulation: basic concepts*. Fed Proc, 1981. **40**(8): p. 2252-6.
92. O'Regan, R.G., *Control of carotid body chemoreceptors by autonomic nerves*. Ir J Med Sci, 1977. **146**(7): p. 199-205.
93. Biscoe, T.J., *Carotid body: structure and function*. Physiol Rev, 1971. **51**(3): p. 437-95.
94. Lahiri, S. and R.G. DeLaney, *Stimulus interaction in the responses of carotid body chemoreceptor single afferent fibers*. Respir Physiol, 1975. **24**(3): p. 249-66.
95. De Burgh Daly, M., C.J. Lambertsen, and A. Schweitzer, *Observations on the volume of blood flow and oxygen utilization of the carotid body in the cat*. J Physiol, 1954. **125**(1): p. 67-89.
96. Kostreva, D.R., et al., *Sympathetic afferent nerve activity of right heart origin*. Am J Physiol, 1975. **229**(4): p. 911-5.

97. Glick, G., A.S. Wechsler, and S.E. Epstein, *Reflex cardiovascular depression produced by stimulation of pulmonary stretch receptors in the dog*. J Clin Invest, 1969. **48**(3): p. 467-73.
98. Thoren, P.N., D.E. Donald, and J.T. Shepherd, *Role of heart and lung receptors with nonmedullated vagal afferents in circulatory control*. Circ Res, 1976. **38**(6 Suppl 2): p. 2-9.
99. Thames, M.D. and F.M. Abboud, *Interaction of somatic and cardiopulmonary receptors in control of renal circulation*. Am J Physiol, 1979. **237**(5): p. H560-5.
100. Grassi, G., et al., *Changes in plasma catecholamines in response to reflex modulation of sympathetic vasoconstrictor tone by cardiopulmonary receptors*. Clin Sci (Lond), 1985. **68**(5): p. 503-10.
101. Egan, B., et al., *Role of cardiopulmonary mechanoreceptors in ADH release in normal humans*. Hypertension, 1984. **6**(6 Pt 1): p. 832-6.
102. Epstein, M., *Water immersion and the kidney: implications for volume regulation*. Undersea Biomed Res, 1984. **11**(2): p. 113-21.
103. Hakumaki, M.O., *Seventy years of the Bainbridge reflex*. Acta Physiol Scand, 1987. **130**(2): p. 177-85.
104. Norberg, K.A., *Transmitter histochemistry of the sympathetic adrenergic nervous system*. Brain Res, 1967. **5**(2): p. 125-70.
105. de Champlain, J., *Do most antihypertensive agents have a sympatholytic action?* Curr Hypertens Rep, 2001. **3**(4): p. 305-13.
106. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 159-93.
107. Skeggs, L.T., et al., *Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system*. Fed Proc, 1967. **26**(1): p. 42-7.
108. Dorer, F.E., et al., *Purification and properties of angiotensin-converting enzyme from hog lung*. Circ Res, 1972. **31**(3): p. 356-66.
109. Ferrario, C.M., et al., *Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)*. Hypertension, 1997. **30**(3 Pt 2): p. 535-41.
110. Dzau, V.J., *Short- and long-term determinants of cardiovascular function and therapy: contributions of circulating and tissue renin-angiotensin systems*. J Cardiovasc Pharmacol, 1989. **14** Suppl 4: p. S1-5.
111. Caldwell, P.R., et al., *Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization*. Science, 1976. **191**(4231): p. 1050-1.
112. Ardaillou, R. and D. Chansel, *Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II*. Kidney Int, 1997. **52**(6): p. 1458-68.
113. Donoghue, M., et al., *A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9*. Circ Res, 2000. **87**(5): p. E1-9.
114. Crackower, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 822-8.
115. Allen, A.M., J. Zhuo, and F.A. Mendelsohn, *Localization and function of angiotensin AT1 receptors*. Am J Hypertens, 2000. **13**(1 Pt 2): p. 31S-38S.
116. Endo, T., et al., *Presynaptic receptor systems on the noradrenergic neurones of the rabbit pulmonary artery*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1977. **296**(3): p. 229-47.
117. Pueyo, M.E., et al., *Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 1): p. C214-20.

118. Altura, B.M. and B.T. Altura, *Vascular smooth muscle and neurohypophyseal hormones*. Fed Proc, 1977. **36**(6): p. 1853-60.
119. Altura, B.M., et al., *Effects of vasoactive agents on isolated human umbilical arteries and veins*. Am J Physiol, 1972. **222**(2): p. 345-55.
120. Vallotton, M.B., et al., *Effects of vasopressin and its analogs on rat aortic smooth muscle and renal medullary tubular cells: characterization of receptor subtypes*. J Cardiovasc Pharmacol, 1986. **8 Suppl 7**: p. S5-11.
121. Vanhoutte, P.M., Z.S. Katusic, and J.T. Shepherd, *Vasopressin induces endothelium-dependent relaxations of cerebral and coronary, but not of systemic arteries*. J Hypertens Suppl, 1984. **2**(3): p. S421-2.
122. Caldicott, W.J., N.K. Hollenberg, and H.L. Abrams, *Characteristics of response of renal vascular bed to contrast media. Evidence for vasoconstriction induced by renin-angiotensin system*. Invest Radiol, 1970. **5**(6): p. 539-47.
123. Davis, J.O., C.C. Carpenter, and C.R. Ayers, *Relation of renin and angiotensin II to the control of aldosterone secretion*. Circ Res, 1962. **11**: p. 171-84.
124. Levine, D.Z., et al., *Surviving rat distal tubule bicarbonate reabsorption: effects of chronic AT(1) blockade*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(3): p. F476-83.
125. Espiritu, D.J., et al., *A central role for Pyk2-Src interaction in coupling diverse stimuli to increased epithelial NBC activity*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(4): p. F663-70.
126. Robey, R.B., et al., *Angiotensin II stimulation of renal epithelial cell Na/HCO<sub>3</sub> cotransport activity: a central role for Src family kinase/classic MAPK pathway coupling*. J Membr Biol, 2002. **187**(2): p. 135-45.
127. Bonjour, J.P. and R.L. Malvin, *Stimulation of ADH release by the renin-angiotensin system*. Am J Physiol, 1970. **218**(6): p. 1555-9.
128. Hayashi, M., et al., *Expression and distribution of aquaporin of collecting duct are regulated by vasopressin V2 receptor in rat kidney*. J Clin Invest, 1994. **94**(5): p. 1778-83.
129. Santos, R.A., et al., *Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs*. Expert Opin Investig Drugs, 2005. **14**(8): p. 1019-31.
130. Pendergrass, K.D., et al., *Differential expression of nuclear AT1 receptors and angiotensin II within the kidney of the male congenic mRen2.Lewis rat*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(6): p. F1497-506.
131. van der Wouden, E.A., et al., *The role of angiotensin(1-7) in renal vasculature of the rat*. J Hypertens, 2006. **24**(10): p. 1971-8.
132. Navar, L.G., et al., *Paracrine regulation of the renal microcirculation*. Physiol Rev, 1996. **76**(2): p. 425-536.
133. Sampaio, W.O., A.A. Nascimento, and R.A. Santos, *Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H1985-94.
134. Dharmani, M., et al., *Effects of angiotensin 1-7 on the actions of angiotensin II in the renal and mesenteric vasculature of hypertensive and streptozotocin-induced diabetic rats*. Eur J Pharmacol, 2007. **561**(1-3): p. 144-50.
135. Heller, J., et al., *Effect of intrarenal infusion of angiotensin-(1-7) in the dog*. Kidney Blood Press Res, 2000. **23**(2): p. 89-94.
136. De Souza, A.M., et al., *Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex Na<sup>+</sup> -ATPase activity through AT2 receptor*. Regul Pept, 2004. **120**(1-3): p. 167-75.

137. Magaldi, A.J., et al., *Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors*. Pflugers Arch, 2003. **447**(2): p. 223-30.
138. Alvarez de la Rosa, D., et al., *SGK1 activates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in amphibian renal epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(2): p. C492-8.
139. Belusa, R., et al., *Mutation of the protein kinase C phosphorylation site on rat alpha1 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alters regulation of intracellular Na<sup>+</sup> and pH and influences cell shape and adhesiveness*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 20179-84.
140. Harvey, B.J., et al., *Rapid responses to aldosterone in the kidney and colon*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. **108**(3-5): p. 310-7.
141. Tong, Q., et al., *Regulation of Na<sup>+</sup> transport by aldosterone: signaling convergence and cross talk between the PI3-K and MAPK1/2 cascades*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(6): p. F1232-8.
142. Haseroth, K., et al., *Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **266**(1): p. 257-61.
143. Markos, F., V. Healy, and B.J. Harvey, *Aldosterone rapidly activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in M-1 cortical collecting duct cells via a PKC-MAPK pathway*. Nephron Physiol, 2005. **99**(1): p. p1-9.
144. Rossol-Haseroth, K., et al., *Mineralocorticoid receptor antagonists do not block rapid ERK activation by aldosterone*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **318**(1): p. 281-8.
145. Mihailidou, A.S., *Nongenomic cardiovascular actions of aldosterone: a receptor for all seasons?* Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 971-2.
146. Mihailidou, A.S. and J.W. Funder, *Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system*. Steroids, 2005. **70**(5-7): p. 347-51.
147. Kuruvilla, L. and C.C. Kartha, *Molecular mechanisms in endothelial regulation of cardiac function*. Mol Cell Biochem, 2003. **253**(1-2): p. 113-23.
148. Schiffrin, E.L., *The endothelium and control of blood vessel function in health and disease*. Clin Invest Med, 1994. **17**(6): p. 602-20.
149. Flavahan, N.A. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction*. Am J Hypertens, 1995. **8**(5 Pt 2): p. 28S-41S.
150. Fishman, A.P., *Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **401**: p. 1-8.
151. Boulanger, C.M. and P.M. Vanhoutte, *G proteins and endothelium-dependent relaxations*. J Vasc Res, 1997. **34**(3): p. 175-85.
152. Rubanyi, G.M., *The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases*. J Cardiovasc Pharmacol, 1993. **22 Suppl 4**: p. S1-14.
153. Mombouli, J.V. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: from physiology to therapy*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 61-74.
154. von Appen, K., et al., *Endothelium: the next frontier in biocompatibility*. Artif Organs, 1993. **17**(12): p. 985-95.
155. Komori, K. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Blood Vessels, 1990. **27**(2-5): p. 238-45.
156. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
157. Bredt, D.S., et al., *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. Nature, 1991. **351**(6329): p. 714-8.

158. Schulz, R., E. Nava, and S. Moncada, *Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium*. Br J Pharmacol, 1992. **105**(3): p. 575-80.
159. Smith, J.A., et al., *Porcine ventricular endocardial cells in culture express the inducible form of nitric oxide synthase*. Br J Pharmacol, 1993. **108**(4): p. 1107-10.
160. Shindo, T., et al., *Nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes and fibroblasts*. Life Sci, 1994. **55**(14): p. 1101-8.
161. Berges, A., et al., *Role of nitric oxide and oxidative stress in ischaemic myocardial injury and preconditioning*. Acta Cardiol, 2003. **58**(2): p. 119-32.
162. Danson, E.J., J.K. Choate, and D.J. Paterson, *Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function*. Pharmacol Ther, 2005. **106**(1): p. 57-74.
163. Ursell, P.C. and M. Mayes, *Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart*. Int J Cardiol, 1995. **50**(3): p. 217-23.
164. Williams, J.C., et al., *The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23341-8.
165. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
166. Rapoport, R.M. and F. Murad, *Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP*. J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res, 1983. **9**(4-5): p. 281-96.
167. Kung, C.F. and T.F. Luscher, *Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta*. Hypertension, 1995. **25**(2): p. 194-200.
168. Lincoln, T.M., P. Komalavilas, and T.L. Cornwell, *Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1141-7.
169. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996. **23**(12): p. 1082-90.
170. McGuire, J.J., H. Ding, and C.R. Triggle, *Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s)*. Can J Physiol Pharmacol, 2001. **79**(6): p. 443-70.
171. Griffith, T.M., *Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?* Br J Pharmacol, 2004. **141**(6): p. 881-903.
172. Busse, R., et al., *EDHF: bringing the concepts together*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(8): p. 374-80.
173. Fisslthaler, B., et al., *Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 493-7.
174. Chauhan, S.D., et al., *Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1426-31.
175. Batenburg, W.W., et al., *L-S-nitrosothiols: endothelium-derived hyperpolarizing factors in porcine coronary arteries?* J Hypertens, 2004. **22**(10): p. 1927-36.
176. Sandow, S.L., *Factors, fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2004. **31**(9): p. 563-70.
177. Nagao, T., S. Illiano, and P.M. Vanhoutte, *Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats*. Am J Physiol, 1992. **263**(4 Pt 2): p. H1090-4.

178. White, D.G. and W. Martin, *Differential control and calcium-dependence of production of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin by pig aortic endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1989. **97**(3): p. 683-90.
179. Coleman, R.A., W.L. Smith, and S. Narumiya, *International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 205-29.
180. Kukovetz, W.R., et al., *Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries*. J Cyclic Nucleotide Res, 1979. **5**(6): p. 469-76.
181. Ribalet, B., S. Ciani, and G.T. Eddlestone, *ATP mediates both activation and inhibition of K(ATP) channel activity via cAMP-dependent protein kinase in insulin-secreting cell lines*. J Gen Physiol, 1989. **94**(4): p. 693-717.
182. Bukoski, R.D., et al., *Intracellular Ca<sup>2+</sup> and force determined simultaneously in isolated resistance arteries*. Am J Physiol, 1989. **257**(5 Pt 2): p. H1728-35.
183. Vanhoutte, P.M. and E.H. Tang, *Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!* J Physiol, 2008.
184. Moncada, S. and J.R. Vane, *Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls*. N Engl J Med, 1979. **300**(20): p. 1142-7.
185. Huang, J.S., et al., *Cell signalling through thromboxane A<sub>2</sub> receptors*. Cell Signal, 2004. **16**(5): p. 521-33.
186. Tang, E.H., et al., *Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(1): p. 15-23.
187. Luscher, T.F. and M. Barton, *Biology of the endothelium*. Clin Cardiol, 1997. **20**(11 Suppl 2): p. II-3-10.
188. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
189. Levin, E.R., *Endothelins*. N Engl J Med, 1995. **333**(6): p. 356-63.
190. Boulanger, C. and T.F. Luscher, *Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide*. J Clin Invest, 1990. **85**(2): p. 587-90.
191. Vanhoutte, P.M., *Endothelin-1. A matter of life and breath*. Nature, 1994. **368**(6473): p. 693-4.
192. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. **74**(6): p. 1141-8.
193. Cai, H., et al., *NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48311-7.
194. Yayama, K., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial NO synthase phosphorylation in thoracic aorta of mice with abdominal aortic banding via type 2 receptor*. Hypertension, 2006. **48**(5): p. 958-64.
195. Santos, R.A. and A.J. Ferreira, *Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2007. **16**(2): p. 122-8.
196. Ferrario, C.M., *Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation*. Hypertension, 2006. **47**(3): p. 515-21.
197. Sampaio, W.O., et al., *Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways*. Hypertension, 2007. **49**(1): p. 185-92.

198. Ramaciotti, C., et al., *Endothelial cells regulate cardiac contractility*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 4033-6.
199. Carey, R.M. and H.M. Siragy, *Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. Endocr Rev, 2003. **24**(3): p. 261-71.
200. Kojda, G. and D. Harrison, *Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 562-71.
201. Pagano, P.J., et al., *Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14483-8.
202. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 976-82.
203. Mohazzab, K.M., P.M. Kaminski, and M.S. Wolin, *NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium*. Am J Physiol, 1994. **266**(6 Pt 2): p. H2568-72.
204. Cai, H., K.K. Griendling, and D.G. Harrison, *The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(9): p. 471-8.
205. Hayashi, Y., et al., *Peroxynitrite formation from human myocardium after ischemia-reperfusion during open heart operation*. Ann Thorac Surg, 2001. **72**(2): p. 571-6.
206. Goldstein, S. and G. Czapski, *The reaction of NO. with O<sub>2</sub>- and HO<sub>2</sub>.: a pulse radiolysis study*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(4): p. 505-10.
207. Pryor, W.A. and G.L. Squadrito, *The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide*. Am J Physiol, 1995. **268**(5 Pt 1): p. L699-722.
208. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
209. Yang, G., et al., *Free radical yields from the homolysis of peroxynitrous acid*. Free Radic Biol Med, 1992. **12**(4): p. 327-30.
210. Squadrito, G.L. and W.A. Pryor, *The nature of reactive species in systems that produce peroxynitrite*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(7): p. 718-9.
211. Nossuli, T.O., et al., *Peroxynitrite reduces myocardial infarct size and preserves coronary endothelium after ischemia and reperfusion in cats*. Circulation, 1997. **96**(7): p. 2317-24.
212. Hamilton, C.A., et al., *Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease*. Clin Sci (Lond), 2004. **106**(3): p. 219-34.
213. Taniyama, Y. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms*. Hypertension, 2003. **42**(6): p. 1075-81.
214. Josephson, R.A., et al., *Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 1991. **266**(4): p. 2354-61.
215. McCafferty, D.M., *Peroxynitrite and inflammatory bowel disease*. Gut, 2000. **46**(3): p. 436-9.
216. Kukreja, R.C., et al., *PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH*. Circ Res, 1986. **59**(6): p. 612-9.

217. Sorescu, D. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure*. *Congest Heart Fail*, 2002. **8**(3): p. 132-40.
218. Ambrosio, G., et al., *Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(25): p. 18532-41.
219. Ellis, A. and C.R. Triggle, *Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003. **81**(11): p. 1013-28.
220. Harrison, R., *Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?* *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(6): p. 774-97.
221. Sanders, S.A., R. Eisenthal, and R. Harrison, *NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion*. *Eur J Biochem*, 1997. **245**(3): p. 541-8.
222. Heinzl, B., et al., *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase*. *Biochem J*, 1992. **281** ( Pt 3): p. 627-30.
223. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. *Circ Res*, 2000. **86**(5): p. 494-501.
224. Rey, F.E., et al., *Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox)*. *Circulation*, 2002. **106**(19): p. 2497-502.
225. Wang, H.D., et al., *Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide*. *Circ Res*, 1998. **82**(7): p. 810-8.
226. Li, J.M. and A.M. Shah, *Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(22): p. 19952-60.
227. Fontayne, A., et al., *Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation*. *Biochemistry*, 2002. **41**(24): p. 7743-50.
228. Shi, Y., et al., *Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(5): p. 739-45.
229. Guzik, T.J., et al., *Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors*. *Circ Res*, 2000. **86**(9): p. E85-90.
230. Leusen, J.H., A.J. Verhoeven, and D. Roos, *Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family*. *Front Biosci*, 1996. **1**: p. d72-90.
231. Lassegue, B., et al., *Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways*. *Circ Res*, 2001. **88**(9): p. 888-94.
232. Meier, B., et al., *The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct*. *Biochem J*, 1993. **289** ( Pt 2): p. 481-6.
233. Jones, O.T., *The regulation of superoxide production by the NADPH oxidase of neutrophils and other mammalian cells*. *Bioessays*, 1994. **16**(12): p. 919-23.
234. Okado-Matsumoto, A. and I. Fridovich, *Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(42): p. 38388-93.

235. Stuehr, D., S. Pou, and G.M. Rosen, *Oxygen reduction by nitric-oxide synthases*. J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14533-6.
236. McIntyre, M., D.F. Bohr, and A.F. Dominiczak, *Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 1): p. 539-45.
237. Lledias, F., P. Rangel, and W. Hansberg, *Oxidation of catalase by singlet oxygen*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10630-7.
238. Hunt, C.R., et al., *Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress*. Cancer Res, 1998. **58**(17): p. 3986-92.
239. Leopold, J.A., et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(3): p. 411-7.
240. Mates, J.M. and F. Sanchez-Jimenez, *Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D339-45.
241. Irani, K., *Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling*. Circ Res, 2000. **87**(3): p. 179-83.
242. Maulik, N. and D.K. Das, *Redox signaling in vascular angiogenesis*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(8): p. 1047-60.
243. Zou, M., C. Martin, and V. Ullrich, *Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite*. Biol Chem, 1997. **378**(7): p. 707-13.
244. Zou, M.H., C. Shi, and R.A. Cohen, *High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 198-203.
245. Milstien, S. and Z. Katusic, *Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(3): p. 681-4.
246. Kunsch, C. and R.M. Medford, *Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature*. Circ Res, 1999. **85**(8): p. 753-66.
247. Meyer, J.W. and M.E. Schmitt, *A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis*. FEBS Lett, 2000. **472**(1): p. 1-4.
248. Panza, J.A., et al., *Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension*. N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 22-7.
249. Nakagami, H., M. Takemoto, and J.K. Liao, *NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(7): p. 851-9.
250. Aubin, M.C., et al., *Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(5): p. 702-10.
251. Liu, Y.B., et al., *Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling, and increased vulnerability to ventricular fibrillation in hypercholesterolemic rabbits*. Circ Res, 2003. **92**(10): p. 1145-52.
252. Liu, Y.H., et al., *Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(6): p. H2616-23.

253. Gong, Y.T., et al., *Probucol attenuates atrial autonomic remodeling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing*. Chin Med J (Engl), 2009. **122**(1): p. 74-82.
254. Levi-Montalcini, R., *Growth Control of Nerve Cells by a Protein Factor and Its Antiserum: Discovery of This Factor May Provide New Leads to Understanding of Some Neurogenetic Processes*. Science, 1964. **143**: p. 105-10.
255. Rush, R.A., *Immunohistochemical localization of endogenous nerve growth factor*. Nature, 1984. **312**(5992): p. 364-7.
256. Lindholm, D., et al., *Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve*. Nature, 1987. **330**(6149): p. 658-9.
257. Guth, L., *Regeneration in the mammalian peripheral nervous system*. Physiol Rev, 1956. **36**(4): p. 441-78.
258. Vracko, R., D. Thorning, and R.G. Frederickson, *Fate of nerve fibers in necrotic, healing, and healed rat myocardium*. Lab Invest, 1990. **63**(4): p. 490-501.
259. Cao, J.M., et al., *Nerve sprouting and sudden cardiac death*. Circ Res, 2000. **86**(7): p. 816-21.
260. de la Monte, S.M., et al., *Oxidative stress and hypoxia-like injury cause Alzheimer-type molecular abnormalities in central nervous system neurons*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(10): p. 1471-81.
261. Lee, Y., et al., *Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13624-9.
262. An, J., et al., *Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 268-74.
263. Unger, R.H., *Lipotoxic diseases*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 319-36.
264. Peterson, L.R., et al., *Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women*. Circulation, 2004. **109**(18): p. 2191-6.
265. Herrero, P., et al., *Increased myocardial fatty acid metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(3): p. 598-604.
266. Carroll, R., et al., *Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(5): p. E900-6.
267. Wang, P., et al., *Impact of altered substrate utilization on cardiac function in isolated hearts from Zucker diabetic fatty rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(5): p. H2102-10.
268. Young, M.E., et al., *Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart*. Diabetes, 2002. **51**(8): p. 2587-95.
269. Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation*. Hypertension, 2005. **45**(5): p. 828-33.
270. Reaven, G. and R. Miller, *Study of the relationship between glucose and insulin responses to an oral glucose load in man*. Diabetes, 1968. **17**(9): p. 560-9.
271. Meglasson, M.D. and F.M. Matschinsky, *Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion*. Diabetes Metab Rev, 1986. **2**(3-4): p. 163-214.
272. Paolisso, G., et al., *Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects*. Diabetologia, 1995. **38**(11): p. 1295-9.
273. Rennert, G., et al., *Size of acute myocardial infarcts in patients with diabetes mellitus*. Am J Cardiol, 1985. **55**(13 Pt 1): p. 1629-30.
274. Padwal, R.S., et al., *The 2007 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 1- blood pressure*

- measurement, diagnosis and assessment of risk.* Can J Cardiol, 2007. **23**(7): p. 529-38.
275. Grassi, G., et al., *Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension.* Hypertension, 1998. **31**(1): p. 68-72.
  276. Feldman, R.D., *Beta-adrenergic receptor alterations in hypertension--physiological and molecular correlates.* Can J Physiol Pharmacol, 1987. **65**(8): p. 1666-72.
  277. Wu, L. and J. de Champlain, *Effects of superoxide on signaling pathways in smooth muscle cells from rats.* Hypertension, 1999. **34**(6): p. 1247-53.
  278. de Champlain, J., *Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension.* J Hypertens Suppl, 1990. **8**(7): p. S77-85.
  279. A, K.L. and J. de Champlain, *[Interaction between the sympathetic and renin-angiotensin system].* Therapie, 1998. **53**(3): p. 245-52.
  280. A, K.L., et al., *Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rat.* Hypertension, 1997. **30**(2 Pt 1): p. 278-87.
  281. Brush, J.E., Jr., et al., *Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy.* N Engl J Med, 1988. **319**(20): p. 1302-7.
  282. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study.* N Engl J Med, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
  283. Folkow, B., *"Structural factor" in primary and secondary hypertension.* Hypertension, 1990. **16**(1): p. 89-101.
  284. Intengan, H.D., et al., *Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension.* Hypertension, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 569-74.
  285. Schiffrin, E.L., *Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture.* Hypertension, 1992. **19**(2 Suppl): p. III-9.
  286. Schiffrin, E.L., *Vascular protection with newer antihypertensive agents.* J Hypertens Suppl, 1998. **16**(5): p. S25-9.
  287. Houghton, J.L., et al., *Relations among impaired coronary flow reserve, left ventricular hypertrophy and thallium perfusion defects in hypertensive patients without obstructive coronary artery disease.* J Am Coll Cardiol, 1990. **15**(1): p. 43-51.
  288. Vogt, M. and B.E. Strauer, *Response of hypertensive left ventricular hypertrophy and coronary microvascular disease to calcium antagonists.* Am J Cardiol, 1995. **76**(13): p. 24D-30D.
  289. Marban, E. and Y. Koretsune, *Cell calcium, oncogenes, and hypertrophy.* Hypertension, 1990. **15**(6 Pt 1): p. 652-8.
  290. Braunwald, E., *A new treatment for hypertrophic cardiomyopathy?* Eur Heart J, 1997. **18**(5): p. 709-10.
  291. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling.* Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
  292. Brilla, C.G. and K.T. Weber, *Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat.* Cardiovasc Res, 1992. **26**(7): p. 671-7.
  293. Kuwahara, F., et al., *Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats.* Circulation, 2002. **106**(1): p. 130-5.

294. Pardo Mindan, F.J. and A. Panizo, *Alterations in the extracellular matrix of the myocardium in essential hypertension*. Eur Heart J, 1993. **14 Suppl J**: p. 12-4.
295. Nicoletti, A. and J.B. Michel, *Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 532-43.
296. Tozzi, C.A., et al., *Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium*. J Clin Invest, 1989. **84**(3): p. 1005-12.
297. Resnick, N. and M.A. Gimbrone, Jr., *Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression*. Faseb J, 1995. **9**(10): p. 874-82.
298. Peacock, A.J., et al., *Endothelin-1 and endothelin-3 induce chemotaxis and replication of pulmonary artery fibroblasts*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992. **7**(5): p. 492-9.
299. Dawes, K.E., et al., *Characterization of fibroblast mitogens and chemoattractants produced by endothelial cells exposed to hypoxia*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **10**(5): p. 552-9.
300. Bishop, J.E. and G. Lindahl, *Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(1): p. 27-44.
301. Haudenschild, C.C., J. Grunwald, and A.V. Chobanian, *Effects of hypertension on migration and proliferation of smooth muscle in culture*. Hypertension, 1985. **7**(3 Pt 2): p. 1101-4.
302. Fujii, S., L. Zhang, and H. Kosaka, *Albuminuria, expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and monocyte chemoattractant protein-1 in the renal tubules of hypertensive Dahl salt-sensitive rats*. Hypertens Res, 2007. **30**(10): p. 991-8.
303. Hinglais, N., et al., *Colocalization of myocardial fibrosis and inflammatory cells in rats*. Lab Invest, 1994. **70**(2): p. 286-94.
304. Haller, H., et al., *Monocyte infiltration and c-fms expression in hearts of spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1995. **25**(1): p. 132-8.
305. Higashiyama, H., et al., *Histopathological study of time course changes in inter-renal aortic banding-induced left ventricular hypertrophy of mice*. Int J Exp Pathol, 2007. **88**(1): p. 31-8.
306. Kato, H., et al., *Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta*. Hypertension, 1996. **28**(2): p. 153-8.
307. Capers, Q.t., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats*. Hypertension, 1997. **30**(6): p. 1397-402.
308. Clozel, M., *Mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors on endothelial function in hypertension*. Hypertension, 1991. **18**(4 Suppl): p. II37-42.
309. Ushio-Fukai, M., et al., *p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23317-21.
310. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
311. Border, W.A. and N.A. Noble, *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis*. N Engl J Med, 1994. **331**(19): p. 1286-92.

312. Villarreal, F.J. and W.H. Dillmann, *Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 2): p. H1861-6.
313. Nickenig, G., et al., *Characterization of angiotensin receptors on human skin fibroblasts*. J Mol Med, 1997. **75**(3): p. 217-22.
314. Karam, H., et al., *Respective role of humoral factors and blood pressure in cardiac remodeling of DOCA hypertensive rats*. Cardiovasc Res, 1996. **31**(2): p. 287-95.
315. Burlew, B.S. and K.T. Weber, *Cardiac fibrosis as a cause of diastolic dysfunction*. Herz, 2002. **27**(2): p. 92-8.
316. Weber, K.T., *Fibrosis and hypertensive heart disease*. Curr Opin Cardiol, 2000. **15**(4): p. 264-72.
317. Varo, N., et al., *Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 1999. **17**(1): p. 107-14.
318. Britten, M.B., A.M. Zeiher, and V. Schachinger, *Clinical importance of coronary endothelial vasodilator dysfunction and therapeutic options*. J Intern Med, 1999. **245**(4): p. 315-27.
319. Esterbauer, H., et al., *The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL*. Free Radic Biol Med, 1992. **13**(4): p. 341-90.
320. Heinecke, J.W., *Cellular mechanisms for the oxidative modification of lipoproteins: implications for atherogenesis*. Coron Artery Dis, 1994. **5**(3): p. 205-10.
321. Jialal, I. and S.M. Grundy, *Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **669**: p. 237-47; discussion 247-8.
322. Keaney, J.F., Jr. and J.A. Vita, *Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action*. Prog Cardiovasc Dis, 1995. **38**(2): p. 129-54.
323. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 223-61.
324. Galkina, E. and K. Ley, *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
325. Hughes, S.E., D. Crossman, and P.A. Hall, *Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(7): p. 1214-9.
326. Liao, J.K., *Endothelium and acute coronary syndromes*. Clin Chem, 1998. **44**(8 Pt 2): p. 1799-808.
327. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
328. Fuster, V., *Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology*. Circulation, 1994. **90**(4): p. 2126-46.
329. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)*. N Engl J Med, 1992. **326**(5): p. 310-8.
330. Fuster, V., et al., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. N Engl J Med, 1992. **326**(4): p. 242-50.

331. Lammie, G.A., P.A. Sandercock, and M.S. Dennis, *Recently occluded intracranial and extracranial carotid arteries. Relevance of the unstable atherosclerotic plaque.* Stroke, 1999. **30**(7): p. 1319-25.
332. Hearse, D.J., *Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century?* Cardiovasc Res, 1994. **28**(12): p. 1737-44: discussion 1745-6.
333. Brooks, W.W., C.H. Conrad, and J.P. Morgan, *Reperfusion induced arrhythmias following ischaemia in intact rat heart: role of intracellular calcium.* Cardiovasc Res, 1995. **29**(4): p. 536-42.
334. Jones, S.P., et al., *Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in a chronic murine model of myocardial reperfusion injury.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(5): p. H2196-201.
335. Anversa, P. and B. Nadal-Ginard, *Myocyte renewal and ventricular remodelling.* Nature, 2002. **415**(6868): p. 240-3.
336. Cleutjens, J.P., et al., *Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction.* J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(6): p. 1281-92.
337. Sun, Y., et al., *Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats.* J Lab Clin Med, 2000. **135**(4): p. 316-23.
338. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions.* J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
339. Detillieux, K.A., et al., *Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium.* Cardiovasc Res, 2003. **57**(1): p. 8-19.
340. Chen, H., et al., *TGF-beta 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(5): p. H1612-7.
341. Fukuda, S., et al., *Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction.* J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(4): p. 547-59.
342. Lee, S.H., et al., *Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction.* N Engl J Med, 2000. **342**(9): p. 626-33.
343. El-Helou, V., et al., *Dexamethasone treatment of post-MI rats attenuates sympathetic innervation of the infarct region.* J Appl Physiol, 2008. **104**(1): p. 150-6.
344. Nori, S.L., et al., *Immunohistochemical evidence for sympathetic denervation and reinnervation after necrotic injury in rat myocardium.* Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1995. **41**(6): p. 799-807.
345. Drapeau, J., et al., *Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction.* J Cell Physiol, 2005. **204**(1): p. 51-62.
346. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing.* Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(11-12): p. 1907-39.
347. Wit, A.L., et al., *Anisotropic reentry in the epicardial border zone of myocardial infarcts.* Ann N Y Acad Sci, 1990. **591**: p. 86-108.
348. Qin, D., et al., *Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium.* Circ Res, 1996. **79**(3): p. 461-73.
349. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling.* J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.

350. Rana, J.S., et al., *Obesity and the risk of death after acute myocardial infarction*. Am Heart J, 2004. **147**(5): p. 841-6.
351. Rea, T.D., et al., *Body mass index and the risk of recurrent coronary events following acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2001. **88**(5): p. 467-72.
352. Thim, T., et al., *Size of myocardial infarction induced by ischaemia/reperfusion is unaltered in rats with metabolic syndrome*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(6): p. 665-71.
353. Eisenstein, E.L., et al., *Elevated body mass index and intermediate-term clinical outcomes after acute coronary syndromes*. Am J Med, 2005. **118**(9): p. 981-90.
354. Kennedy, L.M., et al., *The prognostic importance of body mass index after complicated myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(1): p. 156-8.
355. Greer, J.J., D.P. Ware, and D.J. Lefer, *Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. H146-53.
356. Thakker, G.D., et al., *Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2504-14.
357. Jones, S.P., et al., *Reperfusion injury is not affected by blockade of P-selectin in the diabetic mouse heart*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 2): p. H763-9.
358. Flaherty, J.T. and M.L. Weisfeldt, *Reperfusion injury*. Free Radic Biol Med, 1988. **5**(5-6): p. 409-19.
359. Lefer, D.J., et al., *HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury*. Faseb J, 2001. **15**(8): p. 1454-6.
360. Pinto, J.M. and P.A. Boyden, *Electrical remodeling in ischemia and infarction*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(2): p. 284-97.
361. Vanoli, E. and P.J. Schwartz, *Sympathetic--parasympathetic interaction and sudden death*. Basic Res Cardiol, 1990. **85 Suppl 1**: p. 305-21.
362. Chen, P.S., et al., *Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death*. Cardiovasc Res, 2001. **50**(2): p. 409-16.
363. Oh, Y.S., et al., *Spatial distribution of nerve sprouting after myocardial infarction in mice*. Heart Rhythm, 2006. **3**(6): p. 728-36.
364. Cao, J.M., et al., *Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia*. Circulation, 2000. **101**(16): p. 1960-9.
365. Zhou, S., et al., *Modulation of QT interval by cardiac sympathetic nerve sprouting and the mechanisms of ventricular arrhythmia in a canine model of sudden cardiac death*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2001. **12**(9): p. 1068-73.
366. Miyauchi, Y., et al., *Altered atrial electrical restitution and heterogeneous sympathetic hyperinnervation in hearts with chronic left ventricular myocardial infarction: implications for atrial fibrillation*. Circulation, 2003. **108**(3): p. 360-6.
367. Schwartz, P.J., *QT prolongation, sudden death, and sympathetic imbalance: the pendulum swings*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2001. **12**(9): p. 1074-7.
368. Jiang, H., et al., *Relationship between sympathetic nerve sprouting and repolarization dispersion at peri-infarct zone after myocardial infarction*. Auton Neurosci, 2007. **134**(1-2): p. 18-25.
369. Ieda, M., et al., *Nerve growth factor is critical for cardiac sensory innervation and rescues neuropathy in diabetic hearts*. Circulation, 2006. **114**(22): p. 2351-63.
370. Zhou, S., et al., *Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs*. Circ Res, 2004. **95**(1): p. 76-83.

371. Peters, N.S., et al., *Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia*. *Circulation*, 1997. **95**(4): p. 988-96.
372. Spach, M.S. and J.F. Heidlage, *The stochastic nature of cardiac propagation at a microscopic level. Electrical description of myocardial architecture and its application to conduction*. *Circ Res*, 1995. **76**(3): p. 366-80.
373. Saffitz, J.E., R.B. Schuessler, and K.A. Yamada, *Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias*. *Cardiovasc Res*, 1999. **42**(2): p. 309-17.
374. Pu, J. and P.A. Boyden, *Alterations of Na<sup>+</sup> currents in myocytes from epicardial border zone of the infarcted heart. A possible ionic mechanism for reduced excitability and postrepolarization refractoriness*. *Circ Res*, 1997. **81**(1): p. 110-9.
375. Dillon, S.M., et al., *Influences of anisotropic tissue structure on reentrant circuits in the epicardial border zone of subacute canine infarcts*. *Circ Res*, 1988. **63**(1): p. 182-206.
376. Ishiguro, Y.S., et al., *Early termination of spiral wave reentry by combined blockade of Na<sup>+</sup> and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in a perfused two-dimensional epicardial layer of rabbit ventricular myocardium*. *Heart Rhythm*, 2009. **6**(5): p. 684-92.
377. Lazzara, R., *Mechanisms and management of congenital and acquired long QT syndromes*. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1996. **89 Spec No 1**: p. 51-5.
378. Pogwizd, S.M. and P.B. Corr, *Reentrant and nonreentrant mechanisms contribute to arrhythmogenesis during early myocardial ischemia: results using three-dimensional mapping*. *Circ Res*, 1987. **61**(3): p. 352-71.
379. Fialova, M., et al., *Adaptation of the heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin-43 remodeling*. *Physiol Res*, 2008. **57**(1): p. 7-11.
380. Peters, N.S., et al., *Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts*. *Circulation*, 1993. **88**(3): p. 864-75.
381. Zhao, L.L., et al., *Losartan reduced connexin43 expression in left ventricular myocardium of spontaneously hypertensive rats*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008. **9**(6): p. 448-54.
382. Sasano, C., et al., *Internalization and dephosphorylation of connexin43 in hypertrophied right ventricles of rats with pulmonary hypertension*. *Circ J*, 2007. **71**(3): p. 382-9.
383. Gutstein, D.E., et al., *Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43*. *Circ Res*, 2001. **88**(3): p. 333-9.
384. Kimura, K., et al., *Cardiac sympathetic rejuvenation: a link between nerve function and cardiac hypertrophy*. *Circ Res*, 2007. **100**(12): p. 1755-64.
385. Backs, J., et al., *The neuronal norepinephrine transporter in experimental heart failure: evidence for a posttranscriptional downregulation*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(3): p. 461-72.
386. Poirier, P., et al., *Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism*. *Circulation*, 2006. **113**(6): p. 898-918.

387. Pietrasik, G., et al., *Obesity as a risk factor for sustained ventricular tachyarrhythmias in MADIT II patients*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2007. **18**(2): p. 181-4.
388. Beswick, R.A., et al., *Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response*. Hypertension, 2001. **37**(2 Part 2): p. 781-6.
389. Farquharson, C.A. and A.D. Struthers, *Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 594-7.
390. Renaud, S. and M. de Lorgeril, *Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease*. Lancet, 1992. **339**(8808): p. 1523-6.
391. Das, D.K., et al., *Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants*. Drugs Exp Clin Res, 1999. **25**(2-3): p. 115-20.
392. Vitrac, X., et al., *Distribution of [<sup>14</sup>C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration*. Life Sci, 2003. **72**(20): p. 2219-33.
393. Bertelli, A., et al., *Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity*. Drugs Exp Clin Res, 1998. **24**(3): p. 133-8.
394. Gescher, A.J. and W.P. Steward, *Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(10): p. 953-7.
395. Pervaiz, S., *Resveratrol: from grapevines to mammalian biology*. Faseb J, 2003. **17**(14): p. 1975-85.
396. Baur, J.A. and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(6): p. 493-506.
397. Mukamal, K.J., et al., *Prospective study of alcohol consumption and risk of dementia in older adults*. Jama, 2003. **289**(11): p. 1405-13.
398. Cleophas, T.J., *Wine, beer and spirits and the risk of myocardial infarction: a systematic review*. Biomed Pharmacother, 1999. **53**(9): p. 417-23.
399. Baur, J.A., et al., *Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 337-42.
400. Cao, Z. and Y. Li, *Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury*. Eur J Pharmacol, 2004. **489**(1-2): p. 39-48.
401. Li, Y., Z. Cao, and H. Zhu, *Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress*. Pharmacol Res, 2006. **53**(1): p. 6-15.
402. Mizutani, K., K. Ikeda, and Y. Yamori, *Resveratrol inhibits AGEs-induced proliferation and collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(1): p. 61-7.
403. Brito, P.M., et al., *Resveratrol affords protection against peroxynitrite-mediated endothelial cell death: A role for intracellular glutathione*. Chem Biol Interact, 2006. **164**(3): p. 157-66.
404. Ungvari, Z., et al., *Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(5): p. H2417-24.

405. Nic a' Bhaird, N., et al., *Comparison of the active sites of the purified carnitine acyltransferases from peroxisomes and mitochondria by using a reaction-intermediate analogue*. *Biochem J*, 1993. **294 ( Pt 3)**: p. 645-51.
406. Turrens, J.F., J. Lariccia, and M.G. Nair, *Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats*. *Free Radic Res*, 1997. **27(6)**: p. 557-62.
407. Chen, C.K. and C.R. Pace-Asciak, *Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta*. *Gen Pharmacol*, 1996. **27(2)**: p. 363-6.
408. Li, H.F., S.A. Chen, and S.N. Wu, *Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells*. *Cardiovasc Res*, 2000. **45(4)**: p. 1035-45.
409. Nilius, B., F. Viana, and G. Droogmans, *Ion channels in vascular endothelium*. *Annu Rev Physiol*, 1997. **59**: p. 145-70.
410. Wallerath, T., et al., *Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2002. **106(13)**: p. 1652-8.
411. Klinge, C.M., et al., *Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors alpha and beta in endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280(9)**: p. 7460-8.
412. Inoue, H., et al., *Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice*. *Neurosci Lett*, 2003. **352(3)**: p. 203-6.
413. J, G., et al., *Effects of resveratrol on endothelial progenitor cells and their contributions to reendothelialization in intima-injured rats*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006. **47(5)**: p. 711-21.
414. Li, H.F., et al., *A study of mechanisms involved in vasodilatation induced by resveratrol in isolated porcine coronary artery*. *Physiol Res*, 2006. **55(4)**: p. 365-72.
415. Buluc, M. and E. Demirel-Yilmaz, *Resveratrol decreases calcium sensitivity of vascular smooth muscle and enhances cytosolic calcium increase in endothelium*. *Vascul Pharmacol*, 2006. **44(4)**: p. 231-7.
416. Calderone, V., et al., *Functional contribution of the endothelial component to the vasorelaxing effect of resveratrol and NS 1619, activators of the large-conductance calcium-activated potassium channels*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2007. **375(1)**: p. 73-80.
417. Novakovic, A., et al., *The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery*. *J Pharmacol Sci*, 2006. **101(1)**: p. 85-90.
418. El-Mowafy, A.M., M. Alkhalaf, and S.M. Jaffal, *Nongenomic activation of the GC-A enzyme by resveratrol and estradiol downstream from membrane estrogen receptors in human coronary arterial cells*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2007. **17(7)**: p. 508-16.
419. Soylemez, S., et al., *The effect of long-term resveratrol treatment on relaxation to estrogen in aortae from male and female rats: role of nitric oxide and superoxide*. *Vascul Pharmacol*, 2008. **49(2-3)**: p. 97-105.
420. Silan, C., *The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats*. *Biol Pharm Bull*, 2008. **31(5)**: p. 897-902.
421. Liu, Z., et al., *Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes*. *Sheng Li Xue Bao*, 2005. **57(5)**: p. 599-604.

422. Wallace, C.H., et al., *Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(6): p. 657-65.
423. Chen, W.P., M.J. Su, and L.M. Hung, *In vitro electrophysiological mechanisms for antiarrhythmic efficacy of resveratrol, a red wine antioxidant*. Eur J Pharmacol, 2007. **554**(2-3): p. 196-204.
424. Xiao, J., et al., [*Resveratrol restored the structural and functional association between M3 receptor and connexin 43 gap junction proteins in ischemia-reperfusion injury of isolated rat heart*]. Yao Xue Xue Bao, 2007. **42**(1): p. 19-25.
425. Zhang, Y., et al., *Resveratrol, a natural ingredient of grape skin: antiarrhythmic efficacy and ionic mechanisms*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(4): p. 1192-9.
426. Olson, E.R., et al., *Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(3): p. H1131-8.
427. Mokni, M., et al., *Strong cardioprotective effect of resveratrol, a red wine polyphenol, on isolated rat hearts after ischemia/reperfusion injury*. Arch Biochem Biophys, 2007. **457**(1): p. 1-6.
428. Das, S., et al., *Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of CREB-dependent Bcl-2 signaling via adenosine A3 receptor activation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H328-35.
429. Hattori, R., et al., *Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H1988-95.
430. Sato, M., et al., *Myocardial protection with red wine extract*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(2): p. 263-8.
431. Shen, M., et al., *Cardioprotective effect of resveratrol pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion induced injury in rats*. Vascul Pharmacol, 2006. **45**(2): p. 122-6.
432. Imamura, G., et al., *Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H1996-2003.
433. Hale, S.L. and R.A. Kloner, *Effects of resveratrol, a flavinoid found in red wine, on infarct size in an experimental model of ischemia/reperfusion*. J Stud Alcohol, 2001. **62**(6): p. 730-5.
434. Penumathsa, S.V., et al., *Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(3): p. 508-16.
435. Burstein, B., et al., *Effects of resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) treatment on cardiac remodeling following myocardial infarction*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **323**(3): p. 916-23.
436. Rodrigo, R., et al., *Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(10): p. 625-34.
437. Perez-Vizcaino, F., et al., *Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 67-75.
438. Sasazuki, S., et al., *Relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women*. Ann Epidemiol, 2000. **10**(6): p. 401-8.

439. *MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial.* Lancet, 2002. **360**(9326): p. 23-33.
440. Palumbo, G., et al., *Effects of vitamin E on clinic and ambulatory blood pressure in treated hypertensive patients. Collaborative Group of the Primary Prevention Project (PPP)--Hypertension study.* Am J Hypertens, 2000. **13**(5 Pt 1): p. 564-7.
441. Clarke, M.W., J.R. Burnett, and K.D. Croft, *Vitamin E in human health and disease.* Crit Rev Clin Lab Sci, 2008. **45**(5): p. 417-50.
442. Czernichow, S., et al., *Effect of supplementation with antioxidants upon long-term risk of hypertension in the SU.VI.MAX study: association with plasma antioxidant levels.* J Hypertens, 2005. **23**(11): p. 2013-8.
443. Yusuf, S., et al., *Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.* N Engl J Med, 2000. **342**(3): p. 154-60.
444. Ceriello, A., *Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension.* Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S181-4.
445. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities.* Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S170-80.
446. Farooqi, I.S., et al., *Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency.* J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1093-103.
447. Fantuzzi, G. and R. Faggioni, *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis.* J Leukoc Biol, 2000. **68**(4): p. 437-46.
448. Fantuzzi, G., *Adipose tissue, adipokines, and inflammation.* J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(5): p. 911-9; quiz 920.
449. Charbonneau, A., et al., *Evidence of hepatic glucagon resistance associated with hepatic steatosis: reversal effect of training.* Int J Sports Med, 2005. **26**(6): p. 432-41.
450. Kerr, S., et al., *Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium.* Hypertension, 1999. **33**(6): p. 1353-8.
451. Xue, B., et al., *Diminished baroreflex control of heart rate responses in otoconia-deficient C57BL/6JEi head tilt mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H741-7.
452. Hernandez, I., et al., *17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(5): p. R1599-605.
453. Dahl, L.K., et al., *Role of the gonads in hypertension-prone rats.* J Exp Med, 1975. **142**(3): p. 748-59.
454. Arnal, J.F., et al., *Ethinylestradiol does not enhance the expression of nitric oxide synthase in bovine endothelial cells but increases the release of bioactive nitric oxide by inhibiting superoxide anion production.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4108-13.
455. Russell, K.S., et al., *Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5930-5.
456. Caulin-Glaser, T., et al., *Modulation of circulating cellular adhesion molecules in postmenopausal women with coronary artery disease.* J Am Coll Cardiol, 1998. **31**(7): p. 1555-60.

457. Moss, A.J., et al., *Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction*. N Engl J Med, 2002. **346**(12): p. 877-83.
458. Backenkohler, U., et al., *Long-term incidence of malignant ventricular arrhythmia and shock therapy in patients with primary defibrillator implantation does not differ from event rates in patients treated for survived cardiac arrest*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2005. **16**(5): p. 478-82.
459. Lampert, R., et al., *Gender differences in ventricular arrhythmia recurrence in patients with coronary artery disease and implantable cardioverter-defibrillators*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(12): p. 2293-9.
460. Dash, R., et al., *Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-handling in failing human myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(7): p. 1345-53.
461. Song, M., et al., *Remodeling of Kv4.3 potassium channel gene expression under the control of sex hormones*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31883-90.
462. Vizgirda, V.M., et al., *Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to beta-adrenergic stimulation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(1): p. H256-63.
463. Tamura, T., S. Said, and A.M. Gerdes, *Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure*. Hypertension, 1999. **33**(2): p. 676-80.
464. Hara, M., P. Danilo, Jr., and M.R. Rosen, *Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E4031*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **285**(3): p. 1068-72.
465. Liu, X.K., et al., *Gender difference in the cycle length-dependent QT and potassium currents in rabbits*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **285**(2): p. 672-9.
466. Wasserstrom, J.A., et al., *Characteristics of intracellular Ca<sup>2+</sup> cycling in intact rat heart: a comparison of sex differences*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(5): p. H1895-904.
467. Knezl, V., et al., *Distinct lethal arrhythmias susceptibility is associated with sex-related difference in myocardial connexin-43 expression*. Neuro Endocrinol Lett, 2008. **29**(5): p. 798-801.
468. Rakici, O., et al., *Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery*. Int J Cardiol, 2005. **105**(2): p. 209-15.
469. Liang, C., et al., *Alterations by norepinephrine of cardiac sympathetic nerve terminal function and myocardial beta-adrenergic receptor sensitivity in the ferret: normalization by antioxidant vitamins*. Circulation, 2000. **102**(1): p. 96-103.
470. Johnson, M.S., R.L. Moore, and D.A. Brown, *Sex differences in myocardial infarct size are abolished by sarcolemmal KATP channel blockade in rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2644-47.
471. Julius, S., *The blood pressure seeking properties of the central nervous system*. J Hypertens, 1988. **6**(3): p. 177-85.
472. Xue, B., J. Pamidimukkala, and M. Hay, *Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(5): p. H2177-84.
473. Wu, R., et al., *Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats*. J Hypertens, 2001. **19**(4): p. 741-8.

474. Bertagnolli, M., et al., *Baroreflex sensitivity improvement is associated with decreased oxidative stress in trained spontaneously hypertensive rat*. J Hypertens, 2006. **24**(12): p. 2437-43.
475. Gao, L., et al., *Simvastatin therapy normalizes sympathetic neural control in experimental heart failure: roles of angiotensin II type I receptors and NAD(P)H oxidase*. Circulation, 2005. **112**(12): p. 1763-70.
476. Coskun, B., et al., *Effect of resveratrol on nitrate tolerance in isolated human internal mammary artery*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(3): p. 437-45.
477. Orallo, F., et al., *The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption*. Mol Pharmacol, 2002. **61**(2): p. 294-302.
478. Douglas, P.S., et al., *Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(4): p. 1118-25.
479. Cabral, A.M., et al., *Sex hormone modulation of ventricular hypertrophy in sinoaortic denervated rats*. Hypertension, 1988. **11**(2 Pt 2): p. I93-7.
480. Endo, J., et al., *Bone marrow derived cells are involved in the pathogenesis of cardiac hypertrophy in response to pressure overload*. Circulation, 2007. **116**(10): p. 1176-84.
481. Natelson, B.H., et al., *Patients with epilepsy who die suddenly have cardiac disease*. Arch Neurol, 1998. **55**(6): p. 857-60.
482. Bobik, A., R. Dilley, and P. Kanellakis, *Sympatho-adrenal mechanisms regulating cardiovascular hypertrophy in primary hypertension: a role for rilmenidine?* J Hypertens Suppl, 1998. **16**(3): p. S51-4.
483. Hill, M.F. and P.K. Singal, *Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 291-300.
484. Kinugawa, S., et al., *Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress*. Circ Res, 2000. **87**(5): p. 392-8.
485. Singh, R.B., et al., *Usefulness of antioxidant vitamins in suspected acute myocardial infarction (the Indian experiment of infarct survival-3)*. Am J Cardiol, 1996. **77**(4): p. 232-6.
486. Lindsey, M.L., et al., *Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 753-8.
487. Irani, K., et al., *Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts*. Science, 1997. **275**(5306): p. 1649-52.
488. Arnold, R.S., et al., *Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5550-5.
489. Siwik, D.A., P.J. Pagano, and W.S. Colucci, *Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(1): p. C53-60.
490. Campbell, S.E. and L.C. Katwa, *Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(7): p. 1947-58.
491. Sun, Y. and K.T. Weber, *Infarct scar: a dynamic tissue*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 250-6.

492. Anthonio, R.L., D.J. van Veldhuisen, and W.H. van Gilst, *Left ventricular dilatation after myocardial infarction: ACE inhibitors, beta-blockers, or both?* J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **32 Suppl 1**: p. S1-8.
493. Mankad, S., et al., *Combined angiotensin II receptor antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition further attenuates postinfarction left ventricular remodeling.* Circulation, 2001. **103**(23): p. 2845-50.
494. Diez, J., et al., *Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients.* Circulation, 2002. **105**(21): p. 2512-7.
495. Kuno, A., et al., *Blockade of angiotensin II type I receptors suppressed free radical production and preserved coronary endothelial function in the rabbit heart after myocardial infarction.* J Cardiovasc Pharmacol, 2002. **39**(1): p. 49-57.
496. Sia, Y.T., et al., *Beneficial effects of long-term use of the antioxidant probucol in heart failure in the rat.* Circulation, 2002. **105**(21): p. 2549-55.
497. Bae, S. and L. Zhang, *Gender differences in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in adult rat hearts: focus on Akt and protein kinase C signaling.* J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(3): p. 1125-35.
498. Kenchaiah, S., et al., *Effect of antecedent systemic hypertension on subsequent left ventricular dilation after acute myocardial infarction (from the Survival and Ventricular Enlargement trial).* Am J Cardiol, 2004. **94**(1): p. 1-8.
499. Mozaffari, M.S. and S.W. Schaffer, *Effect of hypertension and hypertension-glucose intolerance on myocardial ischemic injury.* Hypertension, 2003. **42**(5): p. 1042-9.
500. Jain, M., et al., *Influence of gender on the response to hemodynamic overload after myocardial infarction.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(6): p. H2544-50.
501. Dai, W., et al., *Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats: a novel approach to preserve cardiac function after myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(4): p. 714-9.
502. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.* Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
503. Stocker, S.D., R. Meador, and J.M. Adams, *Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats.* Hypertension, 2007. **49**(3): p. 640-6.
504. Alvarez, G.E., et al., *Sympathetic neural activation in visceral obesity.* Circulation, 2002. **106**(20): p. 2533-6.
505. Zupan, I., et al., *Sinus node dysfunction and impairment of global atrial conduction time after high rate atrial and ventricular pacing in dogs.* Pacing Clin Electrophysiol, 2003. **26**(1 Pt 2): p. 507-10.
506. Avitall, B., et al., *Atrial and ventricular fibrosis induced by atrial fibrillation: evidence to support early rhythm control.* Heart Rhythm, 2008. **5**(6): p. 839-45.
507. Burstein, B. and S. Nattel, *Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation.* J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(8): p. 802-9.
508. Levin, B.E., J. Triscari, and A.C. Sullivan, *Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity in rat.* Am J Physiol, 1983. **244**(3): p. R347-55.
509. El-Helou, V., et al., *Resident nestin+ neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium.* Hypertension, 2005. **46**(5): p. 1219-25.

510. Zhang, L.Q. and M. Laato, *Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat*. *Ann Chir Gynaecol*, 2001. **90 Suppl 215**: p. 29-32.
511. Craft, J.M., D.M. Watterson, and L.J. Van Eldik, *Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration*. *Glia*, 2006. **53**(5): p. 484-90.
512. Kaye, M.P., D.J. Wells, and G.M. Tyce, *Nerve growth factor-enhanced reinnervation of surgically denervated canine heart*. *Am J Physiol*, 1979. **236**(4): p. H624-8.
513. Olivieri, G., et al., *Oxidative stress modulates tyrosine kinase receptor A and p75 receptor (low-affinity nerve growth factor receptor) expression in SHSY5Y neuroblastoma cells*. *Neurol Clin Neurophysiol*, 2002. **2002**(2): p. 2-10.
514. Abe, Y., et al., *Proinflammatory cytokines stimulate the expression of nerve growth factor by human intervertebral disc cells*. *Spine*, 2007. **32**(6): p. 635-42.
515. von Boyen, G.B., et al., *Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines*. *J Neuroendocrinol*, 2006. **18**(11): p. 820-5.
516. Bullo, M., et al., *Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women*. *Eur J Endocrinol*, 2007. **157**(3): p. 303-10.
517. Fain, J.N., D.S. Tichansky, and A.K. Madan, *Transforming growth factor beta1 release by human adipose tissue is enhanced in obesity*. *Metabolism*, 2005. **54**(11): p. 1546-51.
518. Severs, N.J., et al., *Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium*. *Cardiovasc Res*, 2008. **80**(1): p. 9-19.
519. Rucker-Martin, C., et al., *Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts*. *Cardiovasc Res*, 2006. **72**(1): p. 69-79.
520. Lerner, D.L., et al., *Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice*. *Circulation*, 2000. **101**(5): p. 547-52.
521. Dodge, S.M., et al., *Effects of angiotensin II on expression of the gap junction channel protein connexin43 in neonatal rat ventricular myocytes*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **32**(3): p. 800-7.
522. Jiang, H., et al., *Effects of sympathetic nerve stimulation on ischemia-induced ventricular arrhythmias by modulating connexin43 in rats*. *Arch Med Res*, 2008. **39**(7): p. 647-54.
523. VanSlyke, J.K., S.M. Deschenes, and L.S. Musil, *Intracellular transport, assembly, and degradation of wild-type and disease-linked mutant gap junction proteins*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(6): p. 1933-46.
524. Laing, J.G. and E.C. Beyer, *The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(44): p. 26399-403.
525. Qin, H., et al., *Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(32): p. 30005-14.
526. Naus, C.C., et al., *Ultrastructural analysis of gap junctions in C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA*. *Exp Cell Res*, 1993. **206**(1): p. 72-84.
527. Ando, M., et al., *Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin43 protein*. *Circulation*, 2005. **112**(2): p. 164-70.

528. Kojima, T., et al., *Effects of oxygen radical scavengers on connexins 32 and 26 expression in primary cultures of adult rat hepatocytes*. Carcinogenesis, 1996. **17**(3): p. 537-44.
529. Yoshizawa, T., et al., *Dimethylsulfoxide maintains intercellular communication by preserving the gap junctional protein connexin32 in primary cultured hepatocyte doublets from rats*. J Gastroenterol Hepatol, 1997. **12**(4): p. 325-30.
530. Lin, D., et al., *Differential phosphorylation of connexin46 and connexin50 by H2O2 activation of protein kinase Cgamma*. Mol Vis, 2004. **10**: p. 688-95.
531. Rakotovo, A., et al., *Selenium status as determinant of connexin-43 dephosphorylation in ex vivo ischemic/reperfused rat myocardium*. J Trace Elem Med Biol, 2005. **19**(1): p. 43-7.
532. Esler, M., et al., *Adrenergic nervous system in heart failure*. Am J Cardiol, 1997. **80**(11A): p. 7L-14L.
533. Cao, F., et al., *The influence of carvedilol on atrial connexin 40 after myocardial infarction*. Acta Cardiol, 2008. **63**(3): p. 303-8.
534. Fan, S.Y., et al., *[The effects of various beta-blockers on myocardial gap junction structure in rat with myocardial ischemia-reperfusion injury]*. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, 2007. **35**(2): p. 182-6.
535. Chua, S., et al., *Comparison of losartan and carvedilol on attenuating inflammatory and oxidative response and preserving energy transcription factors and left ventricular function in dilated cardiomyopathy rats*. Int Heart J, 2008. **49**(5): p. 605-19.