

Université de Montréal

**Rôle du tissu adipeux dans l'effet cardioprotecteur du EP 80317,
un ligand sélectif du récepteur CD36**

par

David Nghi-Nhien Huynh

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Avril, 2012

© David Nghi-Nhien Huynh, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Rôle du tissu adipeux dans l'effet cardioprotecteur du EP 80317,
un ligand sélectif du récepteur CD36**

présenté par :

David Nghi-Nhien Huynh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Fahima Nekka

Présidente-rapporteuse

Sylvie Marleau

Directrice de recherche

Huy Ong

Codirecteur de recherche

Yan Burelle

Membre du jury

Résumé

Le récepteur CD36 est impliqué dans le transport des acides gras libres non estérifiés (AGNE) au niveau des tissus cardiaque et périphériques. Les dommages tissulaires et la dysfonction cardiaque observés après une ischémie-reperfusion (I/R) du myocarde sont en partie liés à l'internalisation et au métabolisme oxydatif accrus des AGNE dont la concentration sanguine augmente transitoirement après un infarctus du myocarde, contrairement à ce qui est observé chez des souris déficientes en CD36. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le EP 80317, un ligand synthétique du récepteur CD36, exercerait un effet cardioprotecteur contre les dommages induits par une ischémie transitoire du myocarde. Nos objectifs étaient 1) de vérifier l'effet cardioprotecteur du EP 80317 et 2) de définir son mécanisme, plus précisément de documenter l'effet du traitement sur le métabolisme lipidique. À cette fin, des souris de type sauvage ont été traitées par le EP 80317 (289 nmol/kg) par voie sous-cutanée pendant 14 jours avant d'être soumises à 30 minutes d'ischémie suivant la ligature de l'artère coronaire gauche descendante et de sa reperfusion pendant une période de 6 ou 48 heures. Le cœur et les tissus périphériques (foie, muscle squelettique et dépôts adipeux) ont été prélevés pour déterminer le profil de certains gènes impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique. Nos travaux ont montré que l'effet cardioprotecteur d'un traitement préventif par le EP 80317 est associé à une augmentation transitoire du stockage des triglycérides et d'une réduction des AGNE circulants.

Mots-clés : CD36, cœur, tissu adipeux, ischémie-reperfusion, acides gras non estérifiés

Summary

The CD36 receptor is involved in the transport of non-esterified fatty acids (NEFA) in cardiac and peripheral tissues. Tissue injury and cardiac dysfunction are in part due to acute internalization and oxidative metabolism of NEFA which concentration rises transiently in the blood following myocardial infarction, in opposition to what is observed in CD36-deficient mice. We hypothesized that EP 80317, a synthetic ligand of the CD36 receptor, provides cardioprotective effect against injuries induced by transient myocardial ischemia. Our objectives were 1) to verify the cardioprotective effect of EP 80317 and 2) to define its mechanism, more precisely to investigate the mechanisms of the treatment on lipid metabolism. For this purpose, wild-type mice were treated with EP 80317 (289 nmol/kg) subcutaneously for 14 days before being submitted to 30 minutes of ischemia following left anterior descending coronary artery ligation and reperfusion for a period of 6 or 48 hours. Heart and peripheral tissues (liver, skeletal muscle and adipose tissue) were harvested to determine the profile of selected genes involved in the regulation of lipid metabolism. Our work has shown that the cardioprotective effect of a pretreatment with EP 80317 is associated with a transient increase of triglycerides storage and reduced circulating NEFA.

Key words: CD36, heart, adipose tissue, ischemia-reperfusion, non-esterified fatty acids

Table des matières

Résumé	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xviii
I. INTRODUCTION	1
1.1. Les maladies cardiovasculaires.....	2
1.1.1. Statistiques.....	2
1.1.2. Classification des maladies cardiovasculaires.....	2
1.1.2.1. Cardiomyopathie non ischémique.....	3
1.1.2.2. Cardiomyopathie ischémique.....	4
1.2. Métabolisme du myocarde.....	7
1.2.1. Condition physiologique	7
1.2.1.1. Métabolisme des acides gras.....	8
1.2.1.2. Métabolisme des glucides	10
1.2.2. Condition ischémique.....	11
1.2.3. Métabolisme du myocarde à la reperfusion.....	13
1.3. Le récepteur CD36.....	15

1.3.1. Structure	15
1.3.2. Distribution cellulaire et rôles biologiques du CD36	18
1.4. Tissu adipeux et métabolisme énergétique	21
1.4.1. Tissu adipeux blanc	21
1.4.1.1. Biosynthèse des triglycérides.....	22
1.4.1.2. La glycéronéogénèse.....	23
1.4.1.3. La gouttelette lipidique	26
1.4.1.4. La lipolyse.....	27
1.4.2. Tissu adipeux brun	30
1.5. Le devenir des AGNE au niveau du foie	31
1.6. Le métabolisme du muscle squelettique	33
1.7. Conséquences possibles de l'augmentation des AGNE dans les tissus périphériques suite à l'ischémie-reperfusion du myocarde	34
1.8. Hypothèse de recherche	35
1.9. Objectifs.....	36
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	38
2.1. Modèle expérimental	39
2.2. Ligature transitoire de l'artère coronaire gauche descendante	39
2.3. Méthodes d'analyse	40
2.3.1. Concentrations plasmatiques de troponine I cardiaque et de lactate sanguin	40

2.3.2. Concentrations plasmatiques des acides gras non estérifiés	41
2.3.3. Développement de la méthode d'analyse par qPCR	42
2.3.3.1. Extraction de l'ARN	42
2.3.3.2. Extraction de l'ARN des tissus adipeux	43
2.3.3.3. Transcriptase inverse.....	45
2.3.3.4. PCR en temps réel.....	45
2.3.3.5. Analyse des résultats.....	50
2.4. Western blot.....	52
2.5. Analyse statistique	54
III. RÉSULTATS	55
3.1. Effet du EP 80317 sur les dommages myocardiques suivant l'ischémie-reperfusion.....	56
3.2. Effet du EP 80317 sur les concentrations plasmatiques des AGNE.....	56
3.3. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux à 6 heures post-reperfusion.....	59
3.3.1. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux épидидymaire à 6 heures post-reperfusion	59
3.3.2. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux périrénal à 6 heures post-reperfusion	61

3.3.3. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux sous-cutané à 6 heures post-reperfusion	62
3.4. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du ventricule gauche à 6 heures post-reperfusion	63
3.5. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du muscle gastrocnémien à 6 heures post-reperfusion.....	64
3.6. Effet du EP 80317 sur l'expression génique hépatique à 6 heures post-reperfusion	65
3.7. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux épидидymaire à 48 heures post-reperfusion.....	66
3.8. Effet du EP 80317 sur la lipolyse au niveau du tissu adipeux épидидymaire.....	66
IV. DISCUSSION	69
4.1. Considérations méthodologiques.....	70
4.2. Effet du EP 80317 sur le cœur.....	72
4.3. Effet du EP 80317 sur le tissu adipeux	77
4.4. Effet du EP 80317 sur les autres tissus périphériques	82
4.5. Conclusion	84
4.6. Perspectives.....	85
Références	88
Annexe.....	109

Liste des tableaux

Tableau I. Conditions du qPCR avec le <i>SYBR Green JumpStart</i>	47
Tableau II. Conditions du qPCR avec le <i>SsoFast EvaGreen</i>	47
Tableau III. Calculs du niveau d'expression du gène <i>Cebpa</i> dans le tissu adipeux sous-cutané	51

Liste des figures

Figure 1.1. Structure du récepteur CD36	17
Figure 1.2. Translocation des acides gras dans les cardiomyocytes	20
Figure 1.3. Étapes de la synthèse des triglycérides et de la lipolyse	23
Figure 1.4. Synthèse des triglycérides par la voie de la glycéronéogénèse.....	25
Figure 1.5. Régulation de la lipolyse dans les adipocytes.....	29
Figure 3.1. Le EP 80317 diminue les dommages au coeur suite à une I/R du myocarde.	57
Figure 3.2. Le EP 80317 diminue la concentration circulante des AGNE à 6 heures, mais pas à 48 heures post-reperfusion.	58
Figure 3.3.1. Le EP 80317 augmente l'expression des gènes responsables du stockage des triglycérides au niveau du tissu adipeux épididymaire à 6 heures de reperfusion.	60
Figure 3.3.2. Aucun changement d'expression des gènes étudiés n'a été induit par un prétraitement par le EP 80317 au niveau du tissu adipeux périrénal.	61
Figure 3.3.3. Le EP 80317 a augmenté de façon significative le niveau d'expression du gène adipogénique <i>Cebpa</i> au niveau du tissu adipeux sous-cutané.	62
Figure 3.4. Aucun changement de l'expression des gènes étudiés n'a été observé après un prétraitement par le EP 80317 au niveau du ventricule gauche.....	63

Figure 3.5. Aucun changement de l'expression des gènes étudiés n'a été observé après un prétraitement par le EP 80317 au niveau du muscle squelettique.	64
Figure 3.6. Un prétraitement par le EP 80317 a augmenté l'expression du gène <i>Cpt1a</i> au niveau du foie.	65
Figure 3.7. Un prétraitement par le EP 80317 n'a pas affecté l'expression des gènes étudiés au niveau de la graisse épидидymaire à 48 heures post-reperfusion.	67
Figure 3.8. Un prétraitement par le EP 80317 n'a pas affecté l'activité lipolytique de la HSL et de la PLIN au niveau du tissu adipeux épидидymaire.	68

Liste des abréviations

μ -TEP, micro-tomographie par émission de positrons

AC, adénylyl cyclase

ACC, acétyl-CoA carboxylase

ACL, citrate lyase

ACS, acyl-CoA synthétase

ADP, adénosine diphosphate

AGLC, acides gras à longues chaînes

AGNE, acide gras non estérifié

AGPAT, 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase

AIF, *apoptosis-inducing factor*

AMP, adénosine monophosphate

AMPc, AMP cyclique

AMPK, *AMP-activated protein kinase*

AP, acide phosphatidique

ATGL, *adipose triglyceride lipase*

ATP, adénosine triphosphate

Atp5b, ATP synthase, sous-unité bêta (gène murin)

C/EBP, *CCAAT/enhancer-binding protein*

Cebpa, *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (gène murin)

CAT, carnitine acétyltransférase

CD36, *cluster of differentiation 36*

Cd36, *cluster of differentiation 36* (gène murin)

Chrebp, *carbohydrate responsive element-binding protein* (gène murin)

CoA, coenzyme-A

Cpt1a, carnitine palmitoyltransférase 1a forme hépatique (gène murin)

Cpt1b, carnitine palmitoyltransférase 1b forme musculaire (gène murin)

CPT-I, carnitine palmitoyltransférase I

CT, *cycle threshold*

DAG, diacylglycérol

DGAT, diacylglycérol acyltransférase

Dgat2, diacylglycérol acyltransférase 2 (gène murin)

DHAP, dihydroxyacétone phosphate

DNL, *de novo lipogenesis*

EDTA, acide éthylène diamine tétraacétique

F¹⁸-FTHA, acide 14 (R, S)- (F¹⁸) fluoro-6-thiaheptadécanoïque

FABP, *fatty acid binding protein*

FADH₂, flavine adénine dinucléotide réduite

FAS, *fatty-acyl synthase*

Fasn, fatty-acyl synthase (gène murin)

FAT, *fatty acid translocase*

FATP, *fatty acid transport protein*

g, force relative de centrifugation

GAPDH, glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

GHRP, *growth hormone releasing peptides*

GHSR-1a, *growth hormone receptor secretagogue type 1a*

Glycérol-3P, glycérol-3-phosphate

GPAT, glycérol-3-phosphate acyl transférase

HC, hormone de croissance

HK, hexokinase

HSL, lipase hormono-sensible

I/R, ischémie-reperfusion

IFN- γ , interferon gamma

IGF, *insulin-like growth factor*

IgG, immunoglobuline G

IL-6, interleukine-6

IRS-1, *insulin receptor substrate-1*

LDH, lactate déshydrogénase

LDL, lipoprotéines de faible densité

LDLox, lipoprotéines de faible densité oxydées

LPA, acide lysophosphatique

MAG, monoacylglycérol

MCD, malonyl-CoA décarboxylase

MEC, matrice extracellulaire

MGL, *monoglyceride lipase*

NADH, nicotinamide adénine dinucléotide réduite

NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PAP, acide phosphatidique phosphatase

Pck1, phosphoénolpyruvate carboxykinase 1 cytosolique (gène murin)

PDE, phosphodiesterase

PDH, pyruvate déshydrogénase

PDK, PDH kinase

PEPCK, phosphoénolpyruvate carboxykinase

PFK-1, phosphofructokinase-1

PGC-1 α , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*

PKA, protéine kinase A

PLIN, périlipine

Plin1, périlipine 1 (gène murin)

Ppara, *peroxisome proliferator-activated receptor a;pha* (gène murin)

Pparg, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (gène murin)

Ppargc1a, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*
(gène murin)

PPAR- γ , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PRDM16, *PR domain containing 16*

PTPm, pore de transition de perméabilité mitochondriale

PVDF, polyfluorure de vinylidène

qPCR, PCR en temps réel

ROS, *reactive oxygen species*

RXR, récepteurs nucléaires X aux rétinoïdes

SDS-PAGE, gel d'électrophorèse de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium

Srebf1, *sterol regulatory element-binding transcription factor 1* (gène murin)

SREBP-1a, *sterol regulatory element binding protein-1a*

SREBP-1c, *sterol regulatory element binding protein-1c*

TG, triglycérides

TIP47, *tail interacting protein* de 47 kDa

TLR, *toll-like receptor*

TMB, 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

TNF- α , facteur alpha de nécrose tumorale

TnIc, troponine I cardiaque

TTBS, *tween tris buffer saline*

TZD, thiazolidinédione

UCP1, *uncoupling protein 1*

Ucp1, *uncoupling protein 1* (gene murin)

VLDL, very low density lipoprotein

Remerciements

J'aimerais commencer par remercier Dre Fahima Nekka et Dr Yan Burelle. Merci d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

J'aimerais remercier mes directeurs de recherche, Dre Sylvie Marleau et Dr Huy Ong, qui m'ont guidé et appuyé tout au long de ma maîtrise. Merci beaucoup Dr Ong pour m'avoir supervisé et donné des conseils très utiles. Vous m'avez beaucoup aidé à développer mon esprit critique. Vous avez toujours eu de très bonnes idées et vous m'avez montré ce que c'est que de « penser en dehors de la boîte ».

Sylvie, je vous remercie infiniment de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir encadré durant ma maîtrise. Vous avez été un excellent mentor, et vous m'avez beaucoup influencé durant mon apprentissage scientifique. J'ai énormément apprécié votre passion pour la science et votre gentillesse qui s'étend hors de la limite du milieu de travail. Je vous suis extrêmement reconnaissant de m'avoir aidé à la préparation de mes présentations orales, qui pouvaient finir très tard en soirée (ou c'était déjà le matin?) et je n'oublierai jamais la patience que vous avez eue pour moi. Vous m'avez beaucoup enseigné du côté scientifique et académique, et vous m'avez fait développer ma confiance en soi. Je vous suis beaucoup plus endetté que vous ne le savez.

Je tiendrais aussi à remercier les membres du laboratoire. Merci à Dilan qui a toujours eu une réponse à toutes mes questions, autant sur un sujet scientifique que général, et qui m'a aidé depuis le début de mon stage d'été jusqu'à la fin de ma maîtrise. Je me sentirai toujours endetté envers toi. Merci à Valérie pour m'avoir montré ce que c'est que de travailler de manière efficace. Merci à Diala pour m'avoir

aidé à développer mon habileté à tout faire. Merci à Jessica de m'avoir énormément enseigné sur les techniques des animaux. Merci à Katia pour le peu de temps qu'on a travaillé ensemble parce que tu apprends trop vite. Merci à Cindy pour ton aide dans la gestion des protocoles des animaux. Merci aussi à Simon, Liliane, Pétra, Kim, Christian et Patrick.

Je remercie mes parents pour leur support et leur amour qu'ils m'ont donné tout au long de ma vie. Je leurs suis extrêmement reconnaissant, et je n'aurai peut-être pas pu en arriver où j'en suis sans leur aide.

Je voudrais aussi remercier deux êtres chers qui m'ont quitté, mais qui m'ont beaucoup influencé dans la vie : ma grand-mère et mon parrain, Mr Donat Gilbert.

Je dédie ce mémoire

à ma mère, à mon père

et à Sylvie

I. INTRODUCTION

1.1. Les maladies cardiovasculaires

1.1.1. Statistiques

Les maladies cardiovasculaires constituent la principale cause de mortalité majeure dans le monde, avec un taux de mortalité estimé à 17,5 millions de personnes à chaque année, représentant 30% de tous les décès pris globalement (Gaziano, 2007). Les statistiques observées au Canada sont similaires, avec plus de 69,5 mille décès, constituant 29% des causes de mortalité en 2008, et une prévalence de 1,3 million de Canadiens atteints d'une maladie du cœur en 2007 (*Fondation des maladies du coeur*, 2011). En 2009, les coûts des soins pour les maladies cardiovasculaires ont été estimés à 22 milliards de dollars au Canada selon la *Fondation des maladies du coeur* (2009).

1.1.2. Classification des maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires regroupent un ensemble de désordres au niveau du cœur et des vaisseaux sanguins, qui inclut entre autres l'angine, l'arythmie, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque, la maladie coronarienne, la péricardite et les accidents vasculaires cérébraux (*Fondation des maladies du coeur*, 2011). Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires incluent la prédisposition génétique, l'habitude de fumer, un taux plasmatique élevé de cholestérol et de lipides, un manque d'activité physique, le diabète, ainsi que l'obésité ou l'embonpoint (Roger *et*

al., 2012). On peut classer les cardiomyopathies dans 2 types de catégories : les cardiomyopathies non ischémiques et les cardiomyopathies ischémiques.

1.1.2.1. Cardiomyopathie non ischémique

On retrouve 4 types de cardiomyopathie dans cette catégorie : dilatée, hypertrophique, restrictive et arythmogène. La cardiomyopathie dilatée est la forme la plus fréquente des cardiomyopathies non ischémiques, caractérisée par une dilatation du ventricule droit et/ou gauche, menant à une dysfonction contractile et à un élargissement du cœur résultant d'un remodelage cardiaque compensatoire. La cause de la cardiomyopathie dilatée peut être la consommation abusive de boissons alcoolisées, de cocaïne, ou encore résulter d'une infection virale. Ces facteurs étant extrinsèques permettent de la qualifier de cardiomyopathie secondaire, tandis que la cardiomyopathie primaire résulte d'une mutation génétique codant pour les protéines sarcomériques dysfonctionnelles. Cependant, dans la majorité des cas, la cause de la cardiomyopathie dilatée demeure inconnue (Hershberger *et al.*, 2010).

La cardiomyopathie hypertrophique est caractérisée par un épaississement de la paroi du ventricule droit et/ou gauche, causée par une prolifération désordonnée des fibroblastes cardiaques et une hypertrophie des cardiomyocytes. Dans la plupart des cas, cette pathologie résulte d'une mutation des gènes codant pour les protéines responsables de la structure cellulaire, dont celles responsables de la fonction contractile du cœur, telles que la chaîne lourde de la bêta-myosine, la protéine C de

liaison à la myosine, les troponines C, I et T, l'alpha-tropomyosine et l'alpha-actine (Marian, 2010).

La cardiomyopathie restrictive est une condition assez rare, où l'on observe une rigidification des parois du cœur, ce qui empêche le ventricule de s'étirer et de se remplir de sang lors de la diastole, tout en ayant une fonction systolique normale. La cardiomyopathie restrictive est souvent précédée d'une autre maladie, telle que la fibrose ou l'amyloïdose, qui provoque une accumulation de protéines dans le tissu (Nihoyannopoulos et Dawson, 2009).

La cardiomyopathie (ou dysplasie) ventriculaire droite arythmogène est une autre condition rare. Elle est causée par un désordre génétique des desmosomes, une classe de protéines d'adhérence, et affecte souvent le ventricule droit. La cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogène est caractérisée par une infiltration et un remplacement du myocarde par du tissu adipeux ou fibro-adipeux suite au phénomène d'apoptose ou de nécrose des cardiomyocytes et d'une dégénération de la fonction des cardiomyocytes (Azaouagh *et al.*, 2011).

1.1.2.2. Cardiomyopathie ischémique

La cardiomyopathie ischémique est la plus fréquente (Samuel *et al.*, 2008). Elle survient lorsqu'il y a une restriction relative ou absolue de l'apport sanguin, qui achemine les éléments essentiels à la fonction cardiaque, tels que l'oxygène et les

substrats énergétiques, vers le cœur. La cardiomyopathie ischémique peut donc se manifester dans les conditions de tachycardie, d'embolisme, d'accident thromboembolique, de malformations des artères ou des veines, ou suite à l'athérosclérose (*Fondation des maladies du coeur*, 2011).

L'athérosclérose est la principale cause de l'ischémie du myocarde. Elle débute par une accumulation de macrophages et de lipoprotéines de faible densité (LDL) dans l'intima (Nakashima *et al.*, 2008) au niveau d'une artère, causée par une dysfonction des cellules endothéliales (Bonetti *et al.*, 2003). Les cellules endothéliales dysfonctionnelles sont perméables aux substances lipidiques, ce qui provoque une accumulation de LDL et de cholestérol. De plus, elles produisent des cytokines et des facteurs chimioattractants, ce qui augmente le recrutement de monocytes (Perrotta, 2011). Les LDL seront retenues dans la matrice extracellulaire (MEC) en se liant aux protéoglycanes, en formant des interactions ioniques avec les chaînes glycosaminoglycanes (Pentikainen *et al.*, 2000). Les LDL sont ensuite oxydées par des enzymes provenant des cellules endothéliales, des macrophages et des cellules musculaires lisses, ce qui rend le LDL athérogène et provoque le recrutement de cellules inflammatoires (Yoshida et Kisugi, 2010). Les monocytes se différencient en macrophages qui internaliseront les LDL oxydées (LDLox) par les récepteurs éboueurs, tel que le CD36 (Silverstein *et al.*, 2010), ce qui entraînera la formation de cellules spumeuses et la sécrétion accrue de cytokines et de chimiokines. Ceci amplifiera la migration de monocytes et l'accumulation de plaquettes, mais induira aussi la migration des cellules musculaires lisses de la média,

qui entraînera la formation d'une chape fibreuse. La chape fibreuse composée principalement de collagène et d'élastine synthétisés par les cellules musculaires lisses et d'une proportion variable de macrophages et de lymphocytes recouvre et stabilise le noyau nécrotique formé de cellules spumeuses, des dépôts de cholestérol et des cellules nécrotiques (Perrotta, 2011). Au cours du temps, la chape fibreuse peut s'amincir et devenir instable par l'action de l'interféron- γ (IFN- γ) relâché par les lymphocytes T qui inhibe la synthèse du collagène par les cellules musculaires lisses, et par différents types de collagénases relâchées par les lymphocytes T, les macrophages et les neutrophiles qui dégradent le collagène retrouvé à la surface de la chape fibreuse (Libby, 2009). La rupture de la chape fibreuse peut subséquemment causer le déversement du noyau nécrotique qui bloque la lumière du vaisseau, ou qui active les plaquettes et la cascade de coagulation, entraînant un rétrécissement ou une obstruction de la lumière du vaisseau; les fragments de la chape fibreuse peuvent aussi être transportés par le courant sanguin et obstruer un vaisseau plus petit (Libby, 2009; Naghavi *et al.*, 2003).

Si le site du thrombus se situe au niveau des vaisseaux coronariens, l'apport du sang vers le cœur est donc réduit ou absent, ce qui mène à l'ischémie du myocarde. Dépendamment du temps d'ischémie, cette condition peut provoquer des troubles métaboliques importants au niveau des cardiomyocytes (Taha et Lopaschuk, 2007) et éventuellement conduire à la mort cellulaire. Afin de préserver la viabilité du tissu cardiaque, l'apport sanguin vers le cœur doit être rétabli rapidement par

l'administration d'agents thrombolytiques tels que l'activateur tissulaire du plasminogène recombinante (t-PA), les agents antiplaquettaires (inhibiteurs des glycoprotéines IIb et IIIa), une procédure non chirurgicale (intervention coronarienne percutanée), une procédure chirurgicale (pontage aortocoronarien), ou une association de ces traitements (Ferdinandy *et al.*, 2007; Ribichini et Wijns, 2002). Toutefois, la reperfusion peut engendrer des changements métaboliques encore plus délétères que ceux observés pendant l'ischémie (Braunwald et Kloner, 1985). Les dommages de la reperfusion vont dépendre de la superficie de la zone infarctée, du flot sanguin collatéral ou résiduel au niveau de l'artère obstruée et de la durée de l'ischémie (Ferdinandy *et al.*, 2007). Ces paramètres détermineront la séquence des événements qui se dérouleront dans la cellule suivant la reperfusion du tissu ischémié et qui conduiront possiblement à la mort cellulaire, telle que détaillée dans les sections 1.2.2 et 1.2.3.

1.2. Métabolisme du myocarde

1.2.1. Condition physiologique

Le cœur est un organe vital qui travaille sans cesse, et qui utilise donc de l'énergie constamment et en grande quantité. En condition physiologique, la contribution des substrats énergétiques du cœur est de 50-70% pour les acides gras

libres non estérifiés (AGNE), 15-20% pour le glucose, 15-20% pour le lactate, et d'environ 5% pour les acides aminés et les corps cétoniques. Quasiment toute la formation de l'adénosine triphosphate (ATP) (90-95%) provient de la phosphorylation oxydative des mitochondries (Benhabbouche *et al.*, 2011; Jaswal *et al.*, 2011). Les cardiomyocytes possèdent une réserve de triglycérides (TG) et de glycogène très limitée, et dépendent ainsi étroitement de la concentration sanguine des substrats exogènes qui constitueront la principale source d'énergie (Hue et Taegtmeyer, 2009).

1.2.1.1. Métabolisme des acides gras

Les cardiomyocytes internalisent, en ordre d'importance, les AGNE qui circulent liés à l'albumine, ou sous forme de chylomicrons ou de lipoprotéines de très faible poids moléculaire (VLDL, *very low density lipoprotein*) (Hauton *et al.*, 2001; Lopaschuk *et al.*, 2010). Les AGNE entrent dans la cellule soit par diffusion passive, un mécanisme qui contribue très faiblement à l'entrée des AGNE, ou à l'aide de protéines dont principalement la translocase d'acides gras (FAT, *fatty acid translocase*, ou CD36, *cluster of differentiation 36*), qui agirait en coopération avec la protéine de liaison d'acides gras (FABP, *fatty acid binding protein*), ou les protéines transporteuses d'acide gras 1 et 6 (FATP, *fatty acid transport protein*) (Schwenk *et al.*, 2008). Les AGNE contenus dans les TG des chylomicrons et VLDL, quant à eux, doivent d'abord être relâchés par l'action de la lipoprotéine lipase retrouvée au niveau du sarcolemme (Lopaschuk *et al.*, 2010). Une fois dans la cellule, les acides gras sont

estérifiés par l'acyl coenzyme A (CoA) synthétase (ACS), pour donner des acyl-CoA à longue chaîne. Les acyl-CoA à longue chaîne peuvent être utilisés pour la synthèse des TG qui servent de réserve d'acides gras, ou convertis en acylcarnitine à longue chaîne par la carnitine palmitoyltransférase I (CPT-I) située à la surface de la membrane externe de la mitochondrie, ce qui permet son entrée dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Murthy et Pande, 1987). L'acylcarnitine à longue chaîne est ensuite reconvertie en acyl-CoA à longue chaîne par la CPT-II située sur la membrane interne de la mitochondrie (McGarry et Brown, 1997). Une fois dans la matrice mitochondriale, l'acyl-CoA à longue chaîne est soumis à la bêta-oxydation afin de générer du nicotinamide adénine dinucléotide réduite (NADH), de la flavine adénine dinucléotide réduite (FADH₂) et de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA produit par l'oxydation des acides gras ou des glucides entrent ensuite dans le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) afin de générer davantage de NADH, de FADH₂ et du GTP (Williamson et Cooper, 1980). Les molécules de NADH et de FADH₂ sont des donneurs d'électron et seront oxydés au niveau de la chaîne respiratoire située dans la membrane interne mitochondriale. La chaîne respiratoire est composée des complexes I à V, qui, suite à une série d'oxydo-réductions, permet de produire un gradient de proton. Lorsqu'un proton de l'espace interstitiel retourne dans la matrice mitochondriale en fonction de son gradient électrochimique, il passe à travers le complexe V, ce qui fournit l'énergie nécessaire pour produire de l'ATP. L'oxygène est l'accepteur final de l'électron qui est transféré tout au long de la chaîne respiratoire pour produire du H₂O (Gautheron, 1984; Kadenbach *et al.*, 2010).

1.2.1.2. Métabolisme des glucides

Le glucose est internalisé dans les cardiomyocytes par les récepteurs GLUT1 et GLUT4 (principalement) (Abel, 2004), puis est rapidement phosphorylé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase (HK) pour sa rétention cellulaire. Le glucose-6-phosphate peut ensuite, 1) soit entrer dans la voie de la glycogénèse pour former du glycogène, ou 2) être catabolisé par la voie de la glycolyse. La glycolyse se résume par une série d'étapes initiée par l'enzyme phosphofructokinase-1 (PFK-1), qui est la première étape irréversible (Mor *et al.*, 2011) et résulte en la formation de 2 molécules de pyruvate, NADH, protons et ATP. Le NAD^+ est essentiel afin de maintenir la glycolyse fonctionnelle et nécessite donc l'oxydation du NADH produit par la glycolyse. En présence d'oxygène, le NADH est oxydé au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, tel que décrit ultérieurement. Par contre, en absence d'oxygène, le NADH est oxydé par la lactate déshydrogénase (LDH), qui convertit le pyruvate en lactate (Barron *et al.*, 2000). Le lactate peut aussi entrer dans la cellule par le transporteur monocarboxylate et être converti en pyruvate par la LDH. Le pyruvate entre ensuite dans la mitochondrie et sera décarboxylé par le pyruvate déshydrogénase (PDH) pour produire de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA permet de générer de l'ATP selon les étapes décrites précédemment.

1.2.2. Condition ischémique

Dans le contexte d'une ischémie du myocarde, il y a une réduction ou une abolition de l'apport en oxygène et en substrats énergétiques. Les cardiomyocytes ne pourront donc plus utiliser la voie métabolique oxydative dans les mitochondries pour produire de l'ATP puisqu'elle requiert l'oxygène comme dernier accepteur d'électron. La cellule doit donc utiliser la glycolyse anaérobie afin de produire de l'ATP et de régénérer le NAD^+ , ce qui résulte en une accumulation de lactate et de H^+ (Robergs *et al.*, 2004). L'accumulation intracellulaire de protons induit une acidose et la cellule tente de rétablir l'homéostasie par les échangeurs Na^+/H^+ , ce qui causera en retour une surcharge de sodium qui activera à son tour l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, et résultera en une surcharge en calcium. Une concentration trop élevée en calcium intracellulaire aura des effets délétères pour la cellule myocardique induisant, entre autres, l'activation de protéases, une dysfonction mitochondriale et une dysfonction contractile (Belardinelli *et al.*, 2006; Orchard *et al.*, 1987; Tani et Neely, 1989).

De façon parallèle, la diminution du rapport ATP sur adénosine monophosphate (AMP) active la protéine kinase activée par AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*), ce qui aura pour conséquence la translocation de GLUT-4 et du CD36 à partir des vésicules de stockage vers le sarcolemme afin d'augmenter le transport du glucose et des AGNE respectivement (Schwenk *et al.*, 2008). Ces événements sont associés à une stimulation de la glycogénolyse (Polekhina *et al.*, 2003) et de la phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), qui a pour effet

d'augmenter l'oxydation des AGNE (Kudo *et al.*, 1995). Le cœur épuise rapidement ses réserves de glycogène. L'accumulation de glucose-6-phosphate et la chute de pH intracellulaire ont un effet inhibiteur sur la HK et la PFK-1 respectivement, ce qui provoque un ralentissement de la voie glycolytique (Depre *et al.*, 1998). L'augmentation du rapport NADH/NAD^+ active la PDH kinase (PDK) et va phosphoryler la PDH ce qui cause son inhibition (Sugden et Holness, 2003). La voie de l'oxydation du pyruvate commence donc déjà à être inhibée à cette étape-ci. Puisque la bêta-oxydation est inhibée, ceci cause une accumulation d'acide gras qui ont une propriété détergente et peuvent attaquer les membranes (Katz et Messineo, 1982). La déplétion d'ATP et les dommages cellulaires mènent éventuellement à la nécrose et à la relâche de facteurs pro-inflammatoires au niveau du tissu lésé (Jordan *et al.*, 1999).

L'ischémie induit un stress sur les cardiomyocytes, ce qui signale au système nerveux de relâcher les catécholamines par les glandes adrénorégiques (Mueller et Ayres, 1978). Une fois dans la circulation sanguine, les catécholamines induisent la relâche d'AGNE dans la circulation en stimulant la lipolyse au niveau du tissu adipeux, tel que détaillé plus bas, et diminue la sécrétion de l'insuline par le pancréas (Opie, 1975).

1.2.3. Métabolisme du myocarde à la reperfusion

Lors de la reperfusion, il y a un apport massif d'oxygène et de substrats énergétiques. Les cardiomyocytes internaliseront préférentiellement les acides gras dont sa concentration sanguine est en hausse. Cela résultera en une oxydation beaucoup plus importante des acides gras plutôt que du pyruvate, d'autant plus que la PDH a déjà commencé à être inhibée lors de l'ischémie. Par la suite, la production massive d'acétyl-CoA par la bêta-oxydation rétro-inhibe la PDH en activant la PDK, favorisant ainsi davantage l'oxydation des acides gras (Bowker-Kinley *et al.*, 1998; Holness et Sugden, 2003). L'oxydation des acides gras produit 2.80 ATP par molécule d'oxygène, tandis que l'oxydation des glucides produit 3.17 ATP par molécule d'oxygène (Collins-Nakai *et al.*, 1994), ce qui signifie une efficacité moindre de production d'ATP par molécule d'oxygène par les acides gras. De plus, la chaîne respiratoire génère, en condition physiologique, une quantité basale de métabolites réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) par les complexes I et III, générant ainsi des anions superoxydes (O_2^-) précurseurs des radicaux hydroxyles (OH) (Murphy, 2009). Lors de la reperfusion, l'oxydation accélérée des acides gras et la dysfonction mitochondriale contribuent à la production excessive de ROS qui iront causer des dommages sur les lipides, les protéines et l'ADN (Murphy, 2009).

La reperfusion permet aux cardiomyocytes d'expulser les protons H^+ plus rapidement par les transporteurs Na^+/H^+ , ce qui résulte en une accumulation de Na^+ ,

puis de Ca^{2+} encore plus prononcée. De plus, le retour du pH vers la valeur normale, l'entrée de calcium dans les mitochondries et la génération des ROS par la chaîne respiratoire sont tous des facteurs qui favorisent l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm) (Benhabbouche *et al.*, 2011). Ceci provoque ensuite la rupture des membranes mitochondriales, suivie d'une déplétion en ATP et d'une production de ROS encore plus importante et de la relâche d'agents pro-apoptotiques, tels que le cytochrome c, le facteur induisant l'apoptose (AIF, *apoptosis-inducing factor*) et l'endonucléase G dans le cytoplasme (Benhabbouche *et al.*, 2011).

Lors de la reperfusion, les cardiomyocytes relâchent des facteurs pro-inflammatoires dont principalement l'interlukine-6 (IL-6) et le facteur alpha de nécrose tumorale ($\text{TNF-}\alpha$, *tumor necrosis factor alpha*) qui induisent la migration des leucocytes, notamment dans la zone en bordure de la zone infarctée (Jordan *et al.*, 1999). Les neutrophiles polymorphonucléaires, ainsi que les cardiomyocytes, possèdent l'enzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase qui génère du O_2^- en oxydant du NADPH, et contribue ainsi davantage à la production de ROS (Dworakowski *et al.*, 2006). La stimulation des leucocytes par les ROS induit la sécrétion de facteurs chimiotactiques et pro-inflammatoires qui à leur tour, amplifient la réponse inflammatoire et augmentent les dommages tissulaires (Buerke *et al.*, 2007). Ce sont par la suite les monocytes qui viennent migrer au niveau de la zone infarctée et se différencient en macrophages. Les macrophages

induiront la cicatrisation des zones endommagées du myocarde par l'augmentation de l'expression du collagène, le recrutement des myofibroblastes et la stimulation de l'angiogénèse (Dewald *et al.*, 2005).

1.3. Le récepteur CD36

1.3.1. Structure

Le récepteur CD36, aussi appelé FAT, SCARB3, GP88 ou glycoprotéine IV, est une protéine de la famille des récepteurs éboueurs (*scavenger*) de type B, exprimé par plusieurs types cellulaires (Hajri et Abumrad, 2002). Composé de 471 acides aminés, le poids moléculaire du CD36 est estimé à 53 kDa. Par contre, un poids moléculaire approximatif de 88 kDa est détecté par électrophorèse sur gel polyacrylamide car la protéine est hautement glycosylée (Silverstein et Febbraio, 2009). En effet, le domaine extracellulaire présente chez l'humain 10 sites de glycosylation sur les asparagines 79, 102, 134, 163, 205, 220, 235, 247, 321 et 417, tandis que la souris en possède 11, dont 3 sont identiques aux humains (Hoosdally *et al.*, 2009). Le CD36 possède aussi 3 ponts disulfures entre les cystéines C243-C311, C272-C333 et C313-C322, et un site de phosphorylation sur la thréonine 92. Le récepteur CD36 est ancré dans la membrane plasmique par 2 segments transmembranaires, en plus de la région entre les acides aminés 184 et 204 qui peut interagir avec la membrane plasmique, et par 4 sites de palmytoylation sur les

cystéines C3 et C7 à l'extrémité N-terminale, et C464 et C466 à l'extrémité C-terminale (Silverstein et Febbraio, 2009; Su et Abumrad, 2009). Un large domaine extracellulaire permet une interaction du récepteur avec de multiples ligands. Parmi les ligands du CD36, la thrombospondine lie les séquences situées entre les acides aminés 93 à 120 (Frieda *et al.*, 1995), les LDLox, les neutrophiles apoptotiques, et les peptides synthétiques dérivés de la famille des sécrétines de l'hormone de croissance (GHRP, *growth hormone releasing peptides*) lient le récepteur entre les acides aminés 155 à 183 (Demers *et al.*, 2004; Navazo *et al.*, 1996; Puente Navazo *et al.*, 1996), les acides gras se lient dans la séquence 127 à 279 des acides aminés (Baillie *et al.*, 1996) et les érythrocytes infectés au *Plasmodium falciparum* entre les acides aminés 139 à 184 (Baruch *et al.*, 1999). La dégradation du CD36 est régulée par ubiquitination de ses résidus lysine 469 et 472 sur sa partie C-terminale, qui est inhibée par l'insuline et augmentée par les acides gras (Su et Abumrad, 2009).

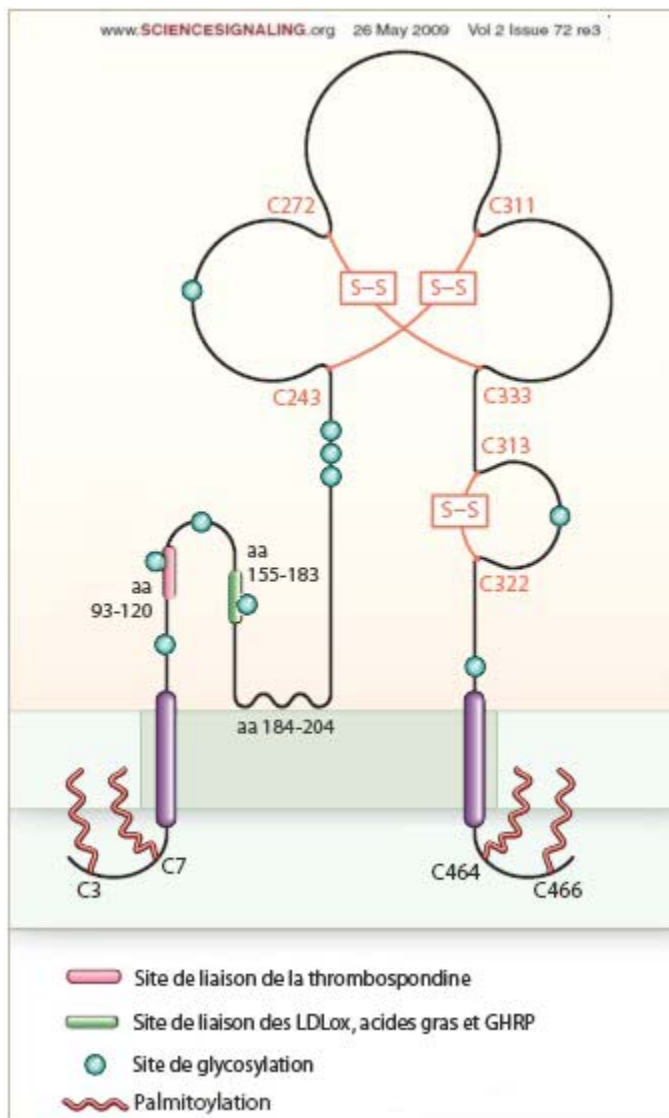


Figure 1.1. Structure du récepteur CD36

Le CD36 est un récepteur ditopique transmembranaire avec une courte queue cytoplasmique aux extrémités C- et N-terminales, et une grande région extracellulaire. La palmytoylation des cystéines C3 et C7 sur l'extrémité N-terminale et C464 et 466 sur l'extrémité C-terminale et l'interaction du domaine hydrophobe situé entre les acides aminés (aa) 184 à 204 avec la membrane plasmique aident à l'ancrage du CD36 à la

membrane. Le domaine extracellulaire possède plusieurs sites de glycosylation et 3 ponts disulfures sur les cystéines C243-C311, C272-C333 et C313-C322. La thrombospondine peut se lier sur le CD36 sur le site entre les acides aminés 93 et 120, les LDLox, et les GHRP entre les acides aminés 155 à 183 et les acides gras entre les acides aminés 127 à 279. (Figure modifiée et traduite de Silverstein, 2009).

1.3.2. Distribution cellulaire et rôles biologiques du CD36

Le récepteur CD36 est largement distribué au niveau de plusieurs types cellulaires et peut avoir des fonctions différentes. Par sa fonction de récepteur éboueur, il contribue à nos mécanismes de défense immunitaire innés par la reconnaissance et l'internalisation de certains pathogènes bactériens ou fongiques, soit directement, ou à titre de co-récepteur pour les *toll-like receptor* (TLR)-2/6 au niveau des monocytes (Triantafilou *et al.*, 2006) et il permet la clairance des leucocytes sénescents ou apoptotiques par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (Febbraio *et al.*, 2001). Cette même fonction lui confère un rôle important dans l'homéostasie du cholestérol par l'internalisation des LDLox et la régulation de l'expression des voies d'efflux du cholestérol par les macrophages (Bujold *et al.*, 2009). Enfin, les voies de signalisation induites par l'activation du CD36 suggèrent qu'il participe à la réaction inflammatoire par la relâche de cytokines (Janabi *et al.*, 2000) et la production de ROS (Kennedy *et al.*, 2011). Ainsi, une régulation inadéquate de l'expression et/ou

de l'activité du CD36 est susceptible de contribuer à la pathogenèse de diverses pathologies, dont notamment l'athérosclérose (Febbraio *et al.*, 2000).

Il a déjà été mentionné plus haut que le CD36 joue aussi un rôle important dans le métabolisme lipidique en facilitant la translocation des acides gras au niveau des cellules musculaires cardiaques, mais ceci s'applique aussi pour les cellules musculaires squelettiques, les cellules adipeuses et les cellules intestinales (Coburn *et al.*, 2001; Nassir *et al.*, 2007). De plus, dans certains types cellulaires dont les muscles cardiaque et squelettique, il a été documenté que le CD36 est emmagasiné dans des vésicules intracellulaires et peut être redistribué à la membrane plasmique après une stimulation par l'insuline (Koonen *et al.*, 2005) ou par la contraction musculaire, qui activent ensuite l'AMPK (Luiken *et al.*, 2003). Récemment, le groupe de Smith *et al.* (2011), ont montré que le CD36 est aussi exprimé à la surface des mitochondries et aiderait à l'entrée et l'oxydation des acides gras.

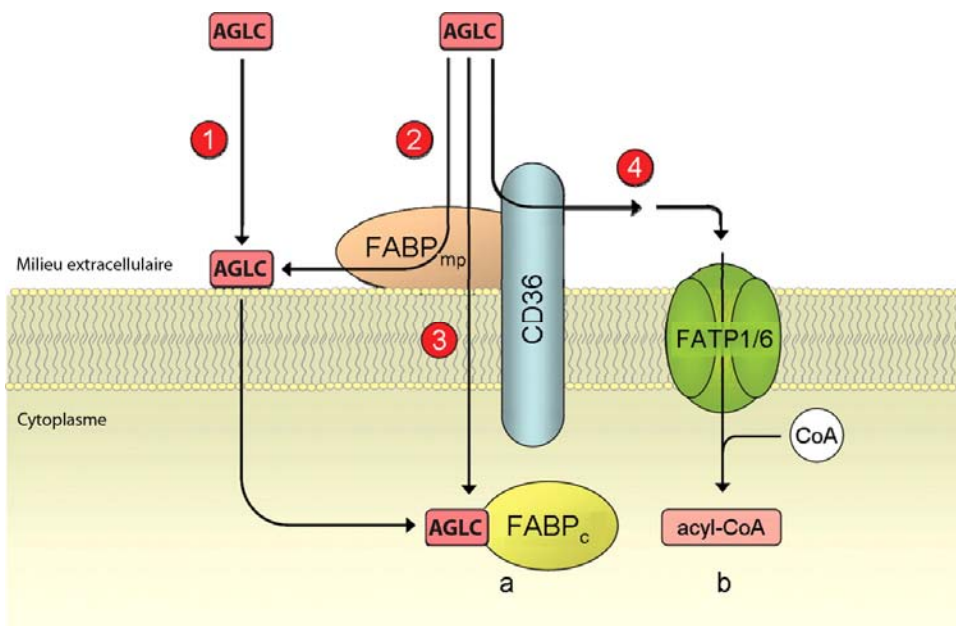


Figure 1.2. Translocation des acides gras dans les cardiomyocytes

Les acides gras étant perméables à la membrane plasmique, ils peuvent diffuser à travers la membrane plasmique (1) mais la vitesse de diffusion passive est trop lente pour fournir les besoins requis à la formation d'ATP par le coeur. Le CD36 joue un rôle facilitateur important dans l'internalisation des acides gras à longues chaînes (AGLC) vers le cytoplasme des cardiomyocytes, mais le mécanisme exact n'est pas encore élucidé. Il est proposé que le FABP localisé à la membrane plasmique (FABP_{mp}) et le CD36 pourraient possiblement lier et concentrer les acides gras à la surface de la cellule afin d'augmenter leur diffusion passive (2), ou que le CD36 transporte lui-même activement les acides gras (3), ou qu'ils les amènent aux FATP1 et FATP6 pour faciliter leur transport (4). (Figure traduite de Schwenk, 2008)

1.4. Tissu adipeux et métabolisme énergétique

1.4.1. Tissu adipeux blanc

Les acides gras fournissent neuf kilocalories d'énergie par gramme, tandis que les glucides et les protéines en fournissent environ quatre (Hunt et Stubbs, 1975). Étant insolubles dans l'eau, les acides gras sont estérifiés en TG qui sont emmagasinés dans les adipocytes, le type cellulaire prédominant du tissu adipeux. Le tissu adipeux est composé d'adipocytes, de fibroblastes, de cellules endothéliales, de macrophages et de leucocytes (Wozniak *et al.*, 2009).

Le tissu adipeux est distribué dans différentes parties du corps et chez l'humain, la plus grande masse se retrouve dans la couche de graisse sous-cutanée (Ross *et al.*, 1992). Le tissu adipeux est en fait considéré comme un organe en soi, capable non seulement d'emmagasiner de l'énergie sous forme de TG et de libérer les acides gras dans la circulation sanguine afin d'être utilisés par les autres organes pendant des moments de privation d'énergie, mais peut aussi sécréter des médiateurs de l'inflammation (Juge-Aubry *et al.*, 2005), des enzymes et des adipokines, ayant un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique (Wozniak *et al.*, 2009).

1.4.1.1. Biosynthèse des triglycérides

La biosynthèse des TG dans les adipocytes requiert des acides gras transformés en acyl-CoA et de le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) provenant de la glycolyse comme substrats (Schlossman et Bell, 1976). Comparativement au muscle squelettique (van Hall *et al.*, 2002) et au foie (MacLennan *et al.*, 2006), les adipocytes expriment très faiblement l'enzyme glycérol kinase qui permet la synthèse des TG à partir du glycérol (Reshef *et al.*, 2003). Tel qu'illustré à la Figure 1.3, le DHAP est transformé en glycérol-3-phosphate (glycérol-3P) par l'enzyme glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Le glycérol-3P est ensuite estérifié en acide lysophosphatique (LPA) par l'addition d'un acyl-CoA par l'enzyme glycérol-3-phosphate acyl transférase (GPAT) au niveau du réticulum endoplasmique. Le LPA est ensuite estérifié en acide phosphatidique (AP) par la 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT). L'AP est converti en 1,2-diacylglycérol (DAG) par l'acide phosphatidique phosphatase (PAP) qui est finalement transformé en TG par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) (Ahmadian *et al.*, 2007). Il est à noter que la majeure partie des acides gras utilisés pour l'acylation provient des acides gras libres liés à l'albumine en circulation qui seront captés par les adipocytes à l'aide du récepteur CD36 (Large *et al.*, 2004).

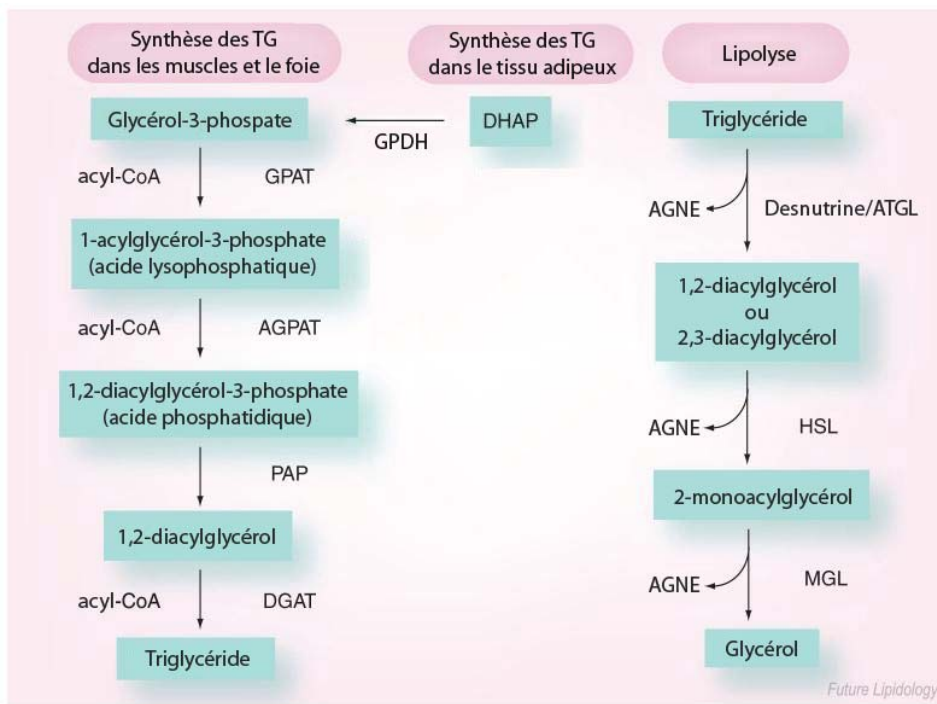


Figure 1.3. Étapes de la synthèse des triglycérides et de la lipolyse

Dans le tissu adipeux, le DHAP provient de la glycolyse, pour ensuite être transformé en glycérol-3P par l'enzyme GPDH. Dans le muscle squelettique et cardiaque et le foie, le glycérol-3-phosphate provient directement du glycérol par l'enzyme glycérol kinase. ATGL: lipase des TG du tissu adipeux (*adipose triglyceride lipase*); GPDH : glycérol-3-phosphate déshydrogénase; HSL: lipase hormono-sensible (*hormone-sensitive lipase*); MGL: lipase des monoglycérides (*monoglyceride lipase*). (Figure modifiée et traduite de Ahmadian, 2007)

1.4.1.2. La glycéronéogénèse

Il existe en fait une autre voie de synthèse des TG, découverte par Ballard *et al.* (1967). Il s'agit de la glycéronéogénèse, une voie de synthèse *de novo* des TG

indépendante du glucose, qui utilise comme substrats des acides aminés, du lactate ou du pyruvate afin de générer le DHAP, qui peut ensuite être transformé en glycérol-3P (Figure 1.4) (Nye *et al.*, 2008). La forme cytosolique de l'enzyme phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C) est une enzyme-clé qui régule la voie de la glycéronéogénèse par la production de phosphoénolpyruvate suite à la décarboxylation de l'oxaloacétate. La PEPCK-C est régulée de manière très aigüe, avec une activation de l'enzyme par les bêta-agonistes et lors du jeûne, et une répression par les glucocorticoïdes et le glucose (Forest *et al.*, 2003). Jusqu'à maintenant, aucune modification post-traductionnelle de la PEPCK-C n'a encore été découverte, signifiant que son activité est reflétée par le niveau de transcription de son gène (Forest *et al.*, 1997). Bien que la PEPCK-C soit régulée par plusieurs facteurs de transcription, le C/EBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein*) serait l'activateur le plus puissant du gène de PEPCK-C (Olswang *et al.*, 2003). La glycéronéogénèse est la voie principalement utilisée lors du jeûne ou d'un stress, parce que le glucose est soit en faible concentration en circulation, ou bien réservé pour les autres organes qui ont un besoin plus important en glucose. La glycéronéogénèse permet donc aux adipocytes de maintenir une certaine activité de synthèse des TG même si la lipolyse est activée, un mécanisme appelé cycle des TG et des acides gras. La contribution relative de la synthèse des TG par la glycolyse ou la glycéronéogénèse varie donc selon l'état nutritionnel ou d'un stress (Bederman *et al.*, 2009).

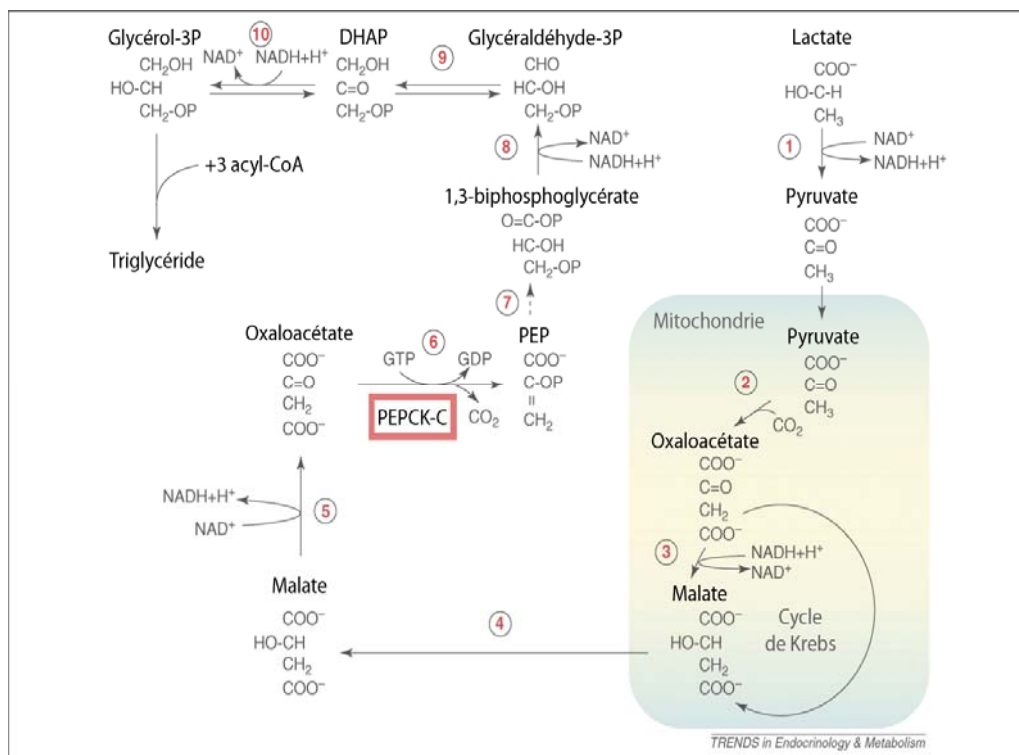


Figure 1.4. Synthèse des triglycérides par la voie de la glycéronéogénèse

La glycéronéogénèse peut débuter soit par (1) la conversion du lactate en pyruvate par la LDH ou directement à partir du pyruvate. Le pyruvate est (2) carboxylé en oxaloacétate dans la mitochondrie et (3) entre dans le cycle de Krebs ou se fait directement réduire en malate par la NAD malate déshydrogénase. Les acides aminés peuvent contribuer à la glycéronéogénèse ici, suite à leur transformation en différents substrats du cycle de Krebs pour aboutir au malate. Le malate (4) sort ensuite de la mitochondrie et (5) se refait oxyder en oxaloacétate par la NAD malate déshydrogénase. La PEPCK-C (6) vient ensuite décarboxyler l'oxaloacétate pour former la phosphoénolpyruvate (PEP) qui est (7) converti en 1,3-biphosphoglycérate par une réaction inverse de la glycolyse, (8) pour ensuite se faire oxyder en glycéraldéhyde-3-phosphate

(glycéraldéhyde-3P) par la glycéraldéhyde-3P déshydrogénase. Le glycéraldéhyde-3P est (9) converti en DHAP par une isomérase et (10) se fait ensuite réduire en glycérol-3-phosphate (glycérol-3P) par la glycérol-3P déshydrogénase. (Figure modifiée et traduite de Nye, 2008)

1.4.1.3. La gouttelette lipidique

Les TG sont regroupés dans un compartiment appelé la gouttelette lipidique au sein de l'adipocyte. Cette gouttelette peut occuper jusqu'à 90% du volume de l'adipocyte (Fei *et al.*, 2011). Ce microenvironnement a pour but de maintenir les TG hors de portée des lipases afin de contrôler la lipolyse, décrite plus bas (Brasaemle *et al.*, 2000). La structure de la gouttelette est complexe, et présente à sa surface plusieurs protéines, dont principalement la périlipine (PLIN) (Greenberg *et al.*, 1991). La PLIN est l'une des premières protéines associées à la gouttelette lipidique qui a été découverte et existe sous deux isoformes, les périlipines A et B, dont l'isoforme A prédomine chez les adipocytes matures (Greenberg *et al.*, 1993). Chez des souris déficientes en PLIN, on observe une lipolyse basale élevée, ce qui entraîne une réduction significative de la masse adipeuse, une réduction de la taille des adipocytes et une résistance à l'obésité normalement induite par une diète riche en lipides (Tansey *et al.*, 2001). La PLIN joue donc un rôle très important dans le stockage et la régulation de la lipolyse des TG. D'autres protéines associées à la gouttelette lipidique ont aussi été identifiées, telles que la cavéoline-1, l'adipophiline et la *tail interacting protein* de 47 kDa (TIP47), mais leurs fonctions sont moins connues (Cohen *et al.*, 2004; Gao et Simon, 2006).

1.4.1.4. La lipolyse

La lipolyse est la libération de glycérol et d'AGNE dans la circulation sanguine à partir des réserves de TG en réponse à des signaux hormonaux ou biochimiques dus à l'état nutritionnel ou à l'activité physique (Frayn *et al.*, 2003). Le jeûne stimule très rapidement la lipolyse par la libération de catécholamines, dont la norépinéphrine, qui se lie sur les récepteurs bêta-adrénergiques (β 1-, β 2- et β 3-adrénergiques) au niveau de la membrane plasmique des adipocytes (Arch et Wilson, 1996; Fain et Garcija-Sainz, 1983). Les récepteurs bêta-adrénergiques sont couplés aux protéines Gs qui transmettent un signal à l'adénylyl cyclase (AC) de générer de l'AMP cyclique (AMPc). Quatre molécules d'AMPc sont nécessaires pour lier les 2 sous-unités régulatrices de la protéine kinase A (PKA) afin d'induire un changement de conformation des sites de pseudosubstrat qui masquent les sites catalytiques (Kim *et al.*, 2005). La dissociation des sous-unités régulatrices des 2 sous-unités catalytiques permet à la PKA de phosphoryler la PLIN, ce qui provoque son détachement de la surface de la gouttelette lipidique (Marcinkiewicz *et al.*, 2006). La PKA phosphoryle et active aussi la lipase hormono-sensible (HSL, *hormone-sensitive lipase*), ce qui provoque sa translocation du cytosol vers la gouttelette lipidique (Egan *et al.*, 1992). La HSL étant activée et les TG lui étant exposés, une hydrolyse en séquence des TG en DAG, puis en monoacylglycérol (MAG) s'ensuit, avec la libération d'un AGNE à chaque étape (Figure 1.3) (Ahmadian *et al.*, 2007).

L'hydrolyse des MAG constitue l'étape finale de la lipolyse avec la libération d'un AGNE et du glycérol.

Toutefois, des études récentes ont montré que l'hydrolyse des TG en DAG, étape limitante de la lipolyse, serait médiée par un autre enzyme que la HSL, la lipase de TG du tissu adipeux (ATGL, *adipose triglyceride lipase*) (Villena *et al.*, 2004). À l'appui, il a été montré que malgré la déficience du gène HSL chez les souris, une activité catabolisante des TG en DAG résiduelle était détectée (Haemmerle *et al.*, 2002). De plus, les MAG seraient aussi hydrolysées par la lipase de monoacylglycérol (MGL, *monoglyceride lipase*), puisque l'hydrolyse de glycérides par la HSL isolée résulte en une accumulation de MAG sans libération de glycérol (Fredrikson *et al.*, 1986).

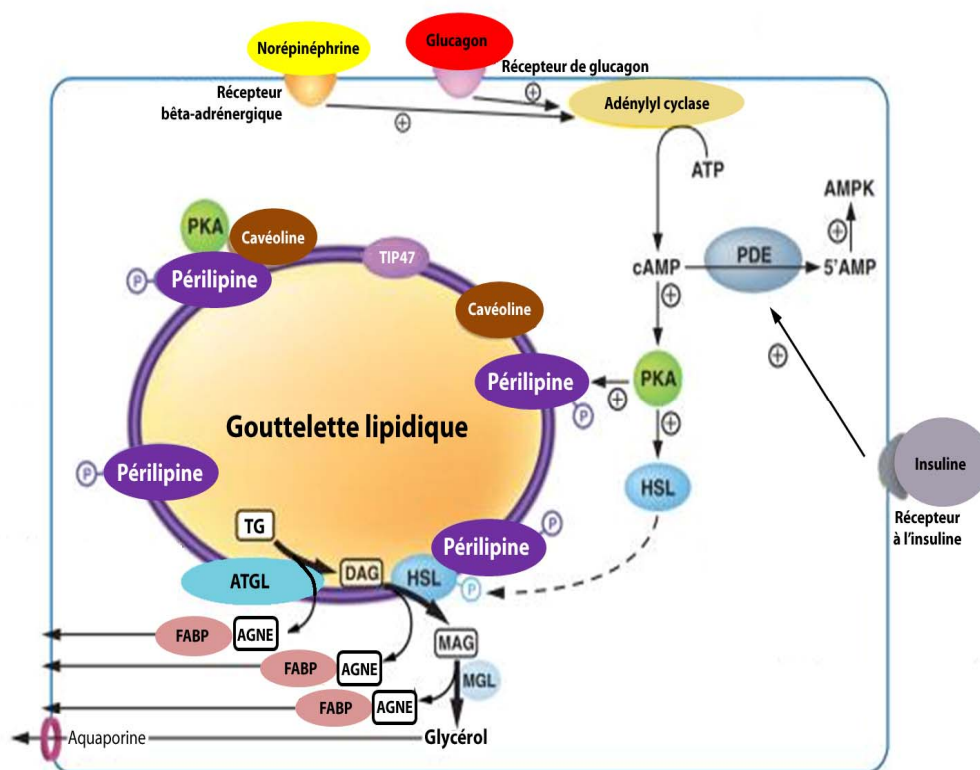


Figure 1.5. Régulation de la lipolyse dans les adipocytes

La sécrétion de la norépinéphrine stimulée par l'état de jeûne ou d'un stress cause sa liaison aux récepteurs bêta-adrénergiques au niveau du tissu adipeux. La réaction s'enchaîne avec l'activation de l'adénylyl cyclase qui va convertir l'ATP en AMPc, et qui va à son tour activer la PKA. La PKA phosphoryle et active la PLIN, ce qui cause sa dissociation de la gouttelette lipidique. La PKA phosphoryle aussi la HSL, ce qui cause son activation et sa translocation à la gouttelette lipidique. Les TG étant exposés, ils sont hydrolysés en DAG par l'ATGL avec la libération d'un AGNE, les DAG sont hydrolysés en MAG par la HSL avec la libération d'un AGNE, et les MAG sont hydrolysés pour libérer un AGNE et une molécule de glycérol. L'insuline inhibe la lipolyse en activant la phosphodiesterase (PDE), ce qui provoque la dégradation de l'AMPc en 5'AMP. L'AMP va activer l'AMPK, ce qui causera une

réduction de la lipolyse. (Figure modifiée et traduite de Duncan *et al.*, 2007).

1.4.2. Tissu adipeux brun

Il existe un deuxième type de tissu adipeux, nommé le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux brun possède un rôle distinct du tissu adipeux blanc, étant retrouvé en plus grande quantité chez les mammifères nouveau-nés, les petits mammifères et les animaux hibernants, et disparaissant au cours du temps chez les animaux adultes de grande taille (Virtanen *et al.*, 2009). La fonction principale du tissu adipeux brun est la thermogénèse, permettant de réguler la température corporelle et de résister contre le froid (Cannon et Nedergaard, 2004). Cette activité très particulière du tissu adipeux brun est due principalement à une protéine exprimée presque exclusivement au niveau de la mitochondrie du tissu adipeux brun, la protéine découplante (UCP1, *uncoupling protein 1*) (Matthias *et al.*, 2000).

Les mitochondries, présentes dans presque toutes les cellules, contribuent de façon essentielle à la respiration cellulaire, ce qui permet de produire de l'ATP à partir de substrats énergétiques, dont les acides gras internalisés à l'aide du récepteur CD36. Toutefois, les adipocytes du tissu adipeux brun contiennent beaucoup plus de mitochondries que les adipocytes du tissu adipeux blanc (Virtanen *et al.*, 2009). L'UCP1 est un transporteur de protons situé au niveau de la membrane interne des

mitochondries qui cause une dissipation du gradient de protons à travers la membrane court-circuitant ainsi l'ATP synthétase (Virtanen *et al.*, 2009). Ceci résulte en une libération d'énergie sous forme de chaleur, d'une absence de phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP, et donc d'une accélération de la respiration cellulaire et de l'oxydation des acides gras puisqu'il y a épuisement d'énergie. On obtient donc un processus exclusivement thermogénique, et le tissu adipeux brun étant hautement vascularisé permet d'évacuer la chaleur vers les organes vitaux (Nisoli *et al.*, 1997). L'UCP1 est régulée par le système nerveux sympathique, notamment par la norépinéphrine, qui lie le récepteur bêta3-adrénergique à la surface de la cellule. Le mécanisme exact d'activation de UCP1 n'est pas encore élucidé, mais serait probablement dû à l'activation des récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR- γ , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) qui régulent la biogénèse mitochondriale et la lipolyse par la relâche des acides gras qui servent de substrats pour la bêta-oxydation (Nedergaard *et al.*, 2001; Nedergaard *et al.*, 2005).

1.5. Le devenir des AGNE au niveau du foie

Le foie, tout comme le tissu adipeux, est capable de synthétiser des acides gras à partir de substrats non-lipidiques, un processus qui s'appelle la lipogénèse *de novo* (DNL, *de novo lipogenesis*) (Chong *et al.*, 2008). Par contre, en termes d'acides gras produits par poids de tissu, le foie qui pèse environ 1,5 kg chez l'humain, en produit

autant que le tissu adipeux qui pèse environ 10-15 kg. (Large *et al.*, 2004). Il existe une balance entre la production d'acides gras par la DNL et l'utilisation des acides gras par leur oxydation et estérification en TG (Roden, 2006).

Le foie exprime très faiblement le CD36 en condition physiologique (Miquilena-Colina *et al.*, 2011), mais son expression peut être augmentée dans certaines conditions comme le diabète ou une diète riche en lipides (Koonen *et al.*, 2007). Les AGNE entrent dans les hépatocytes à l'aide du FABP et des FATP2 et FATP5 principalement (Stahl *et al.*, 2001). Comme expliqué pour le cœur, les AGNE seront acylés et seront stockés en TG pour être éventuellement relâchés en circulation sous forme de VLDL, ou entreront dans la mitochondrie pour se faire oxyder (Gibbons *et al.*, 2000). L'oxydation des acides gras produit un acétyl-CoA, un FADH₂, un NADH et un acide gras raccourci de 2 carbones qui poursuivra le cycle d'oxydation. L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs et produit davantage de FADH₂ et de NADH qui iront ensuite dans la chaîne respiratoire pour générer de l'ATP. Par contre, une accumulation éventuelle d'acétyl-CoA dans la mitochondrie pourrait provoquer son accumulation subséquente dans le cytosol par l'action de la carnitine acétyltransférase (CAT). Une autre voie permettrait à l'acétyl-CoA d'entrer dans le cycle de Krebs pour générer du citrate, ensuite transporté dans le cytosol par un transporteur de citrate pour être converti à nouveau en acétyl-CoA par l'enzyme ATP citrate lyase (ACL) (Wakil et Abu-Elheiga, 2009). L'acétyl-CoA cytosolique est ensuite carboxylé par l'ACC pour former du malonyl-CoA. Il existe deux isoformes

d'ACC, l'ACC1 retrouvée dans le cytosol et l'ACC2 retrouvée sur la membrane externe mitochondriale (Thampy, 1989). Le malonyl-CoA formé par l'ACC1 est ensuite transformé en palmitate par l'enzyme synthase d'acyl-CoA (FAS, *fatty-acyl synthase*), ce qui marque la DNL par la production d'acides gras à partir de substrats lipidiques (à noter que l'acétyl-CoA peut aussi provenir de l'oxydation du glucose) (Kim *et al.*, 1989). En parallèle, le malonyl-CoA formé par l'ACC2 est un inhibiteur allostérique de CPT1, ce qui empêche l'entrée de l'acyl-CoA dans la mitochondrie et par conséquent, inhibe l'oxydation des acides gras (Akkaoui *et al.*, 2009). Lorsque le rapport ATP/AMP diminue, l'AMPK est activée et inhibe l'ACC1 et l'ACC2 par phosphorylation, ce qui diminue la concentration de malonyl-CoA et par conséquent, diminue la lipogénèse et lève son action inhibitrice sur CPT1 (Winder et Hardie, 1999). L'AMPK activerait aussi la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) par phosphorylation, ce qui induit la dégradation du malonyl-CoA (Park *et al.*, 2002). L'ACC1 et ACC2 sont aussi régulés par une rétro-inhibition allostérique par les acyl-CoA (Saggerson, 2008).

1.6. Le métabolisme du muscle squelettique

Contrairement au muscle cardiaque, le muscle squelettique est un organe à contraction volontaire (Berger *et al.*, 1976). Au repos, environ 70% du glucose internalisé par le cœur entre dans la voie de la glycolyse, comparativement au muscle squelettique qui n'en n'utilise qu'environ 20% pour la glycolyse; le reste du glucose

est stocké sous forme de glycogène (Berger *et al.*, 1976). Lors d'une stimulation par l'insuline, le muscle squelettique à lui seul peut internaliser entre 75-95% du glucose total circulant (Baron *et al.*, 1988). Le muscle squelettique est aussi capable d'oxyder les acides gras ou de les stocker sous forme de TG (Kelley *et al.*, 1999).

1.7. Conséquences possibles de l'augmentation des AGNE dans les tissus périphériques suite à l'ischémie-reperfusion du myocarde

Lors d'une ischémie-reperfusion (I/R) du myocarde, il y a principalement deux événements qui surviennent en périphérie: la relâche de catécholamines et une augmentation d'AGNE circulants après l'activation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux blanc (Opie, 1975). Une concentration plasmatique élevée en AGNE cause leur capture, entre autres par le cœur, le foie et le muscle squelettique qui les utilisent comme principal substrat énergétique (Dulloo *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2000). De plus, il a été rapporté que certains traitements pharmacologiques, tel que les thiazolidinediones (TZD) qui modulent l'activité de PPAR- γ (Bedoucha *et al.*, 2001), une voie de signalisation couplée au CD36 (Marleau *et al.*, 2005; Nisoli *et al.*, 2000), peuvent faire augmenter l'expression de protéines couplées à la DNL et à l'internalisation des AGNE (Boelsterli et Bedoucha, 2002). Lorsque l'entrée massive d'AGNE, principalement par le récepteur CD36, dépasse la capacité de la cellule à les

oxyder, ils sont accumulés sous forme de TG, ce qui peut éventuellement conduire à une lipotoxicité cellulaire (Schaffer, 2003). Tel que mentionné plus haut, les acyl-CoA ont des propriétés détergentes et peuvent solubiliser les membranes mitochondriales et plasmiques (Katz et Messineo, 1982). Au niveau du muscle squelettique, la lipotoxicité peut mener à la résistance à l'insuline par l'intermédiaire des acyl-CoA qui activent la protéine kinase C, qui va induire la phosphorylation du substrat au récepteur à l'insuline (IRS-1, *insulin receptor substrate-1*), ce qui empêche l'activation du récepteur à l'insuline lors de la liaison avec son ligand, et réduit ainsi la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmique (Lowell et Shulman, 2005). Au niveau du foie, la lipotoxicité peut conduire à la stéatose hépatique, puis éventuellement à la stéatohépatite par la génération de ROS lors de l'oxydation excessive des acides gras dans la mitochondrie, mais aussi par une voie alternative dans les peroxysomes et les microsomes, ce qui va mener à une réaction inflammatoire (Browning et Horton, 2004).

1.8. Hypothèse de recherche

Des études antérieures dans notre laboratoire ont montré qu'un prétraitement avec des ligands sélectifs du CD36, tel le EP 80317, exerce un effet cardioprotecteur après une I/R du myocarde en réduisant la taille de l'infarctus (Bessi, 2012 *et al.*, publication en révision, *Cardiovasc. Res.*). Toutefois, les effets bénéfiques du EP 80317 semblent être liés en partie à un effet extra-cardiaque. En effet, l'injection d'un

substrat lipidique radiomarqué au F^{18} , l'acide 14 (R, S)- (F^{18}) fluoro-6-thiaheptadécanoïque (F^{18} -FTHA) chez des souris soumises à une ischémie transitoire du myocarde, a montré une réduction de la quantité globale d'acides gras captés par le cœur par la technique de micro-tomographie par émission de positrons (μ -TEP). Cette observation, associée à la réduction des taux d'AGNE plasmatiques nous a conduit à émettre l'hypothèse de recherche selon laquelle les ligands sélectifs du CD36 agissent sur les tissus périphériques, en particulier le tissu adipeux, pour réguler à la baisse les concentrations circulantes d'AGNE.

1.9. Objectifs

Notre objectif principal était d'identifier le mécanisme d'action du EP 80317 sur les tissus périphériques. Pour ce faire, nous avons mesuré l'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme lipidique par PCR en temps réel (qPCR, pour *quantitative real time polymerase chain reaction*) puisque cette méthode nous permettait de faire plusieurs essais avec une quantité limitée de tissu. J'ai optimisé les conditions pour le qPCR de chacun des gènes ciblés, selon le tissu (différents dépôts de tissu adipeux, foie, muscle squelettique) afin d'obtenir des résultats reproductibles et fiables.

Nous avons vérifié les changements potentiels du niveau d'expression des gènes impliqués dans la thermogénèse, ce qui aurait pu indiquer une conversion du phénotype du tissu adipeux blanc en tissu adipeux brun induit par un prétraitement avec le EP 80317. Nous avons aussi évalué les changements potentiels de l'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse et le stockage des TG dans le tissu adipeux blanc.

De plus, nous avons mesuré l'expression de certains gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des acides gras au niveau des tissus musculaire et hépatique suite à un prétraitement avec le EP 80317 suivi d'une I/R du myocarde afin : 1) d'investiguer comment ces tissus périphériques pouvaient contribuer à moduler les taux circulants d'AGNE, et 2) de vérifier qu'un traitement pharmacologique de 14 jours avec le EP 80317 ne causait pas d'effets néfastes (accumulation d'acides gras) dans ces tissus.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Modèle expérimental

Toutes les procédures expérimentales réalisées *in vivo* ont été approuvées par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal, en conformité avec les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux. Des souris mâles de type sauvage C57BL/6 ou déficientes en CD36 ont été sevrées à 3 semaines d'âge et nourries avec une diète normale (Harlan 2918, Indianapolis, États-Unis). Entre 16 à 20 semaines d'âge, les souris ont été séparées en 2 groupes de façon aléatoire et ont été traitées avec le véhicule (NaCl 0,9%) ou un ligand synthétique du CD36, le EP 80317, à une dose quotidienne de 289 nmol/kg par voie sous-cutanée pendant 14 jours. Un total de 118 souris de type sauvage a été utilisé aux fins de différentes expérimentations visant des mesures planimétriques (tailles d'infarctus (2 groupes de 7 souris), de fonction cardiaque (4 groupes de 8 souris) et d'imagerie par μ -TEP (2 groupes de 36 souris).

2.2. Ligature transitoire de l'artère coronaire gauche descendante

La ligature transitoire de l'artère coronaire gauche descendante a été réalisée selon la méthode de Tarnavski *et al.* (2004) tel que détaillé dans Bessi *et al.* (2012) (article en annexe).

Les souris anesthésiées à l'isoflurane ont été sacrifiées 6 ou 48 heures suivant la reperfusion par exsanguination. Le sang cardiaque a été prélevé sur acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) (4 mM) par ponction au niveau du ventricule droit et le plasma collecté par centrifugation pendant 5 minutes à 1 500 *g* à 37°C a été conservé à -80°C pour l'analyse des profils énergétiques (AGNE, TG, glycémie, troponine I cardiaque (TnIc) et lactate) et hormonaux (insuline et catécholamines). Après la perfusion du cœur avec de la saline contenant 10 U/mL d'héparine, les tissus, incluant le cœur, les muscles gastrocnemius et soleus, le foie, ainsi que les tissus adipeux épидидymaire, rétro-péritonéal et sous-cutané ont été prélevés et conservés.

2.3. Méthodes d'analyse

2.3.1. Concentrations plasmatiques de troponine I cardiaque et de lactate sanguin

Afin de corroborer les résultats de l'analyse planimétrique de la taille de l'infarctus chez nos différents groupes expérimentaux, le taux plasmatique de TnIc a été mesuré à l'aide de la trousse *Elisa High Sensitivity Mouse Cardiac Troponin-I* (Life Diagnostic, West Chester, PA) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 100 μ L des échantillons dilués 1:4 dans du diluant sont incubés pendant

60 minutes à la température de la pièce sous faible agitation avec 100 μL d'anticorps anti-TnIc conjugué à la peroxydase de raifort dans une plaque de 96 puits. Les puits sont lavés 6 fois avec la solution de rinçage, puis incubés à nouveau pendant 20 minutes sous faible agitation avec le substrat chromogénique, le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). La réaction enzymatique est arrêtée avec 100 μL de solution d'arrêt (HCl 1N), et la densité optique est lue à 450 nm. La concentration est obtenue par extrapolation à partir d'une courbe d'étalonnage de TnIc.

Le lactate a été mesuré 5 minutes après le début de la reperfusion dans le sang total à l'aide de bandelettes et de l'appareil *Lactate Pro Test Meter* (Arkray, Kyoto, Japan).

2.3.2. Concentrations plasmatiques des acides gras non estérifiés

Les concentrations plasmatiques des AGNE ont été mesurées à l'aide de la trousse *Wako NEFA-HR(2)* (Wako Pure chemicals industries, Osaka, Japan), selon les instructions du manufacturier. Brièvement, 5 μL des échantillons ont été mélangés avec 200 μL de solution A contenant, entre autres, de l'acyl-coenzyme A synthétase (0,53 U/mL), dans une plaque de 96 puits et incubés à 37°C pendant 5 minutes. L'absorbance est ensuite obtenue par lecture d'absorbance bichromatique différentielle à la longueur d'onde à $\lambda 550$ nm et à $\lambda 660$ nm. Ensuite, 100 μL de la

solution B, contenant de l'acyl-coenzyme A oxydase (12 U/mL) et de la peroxydase (14 U/mL), sont ajoutées à chaque échantillon, et cette étape est suivie d'une autre incubation à 37°C pendant 5 minutes. L'absorbance est remesurée aux mêmes longueurs d'onde. Les valeurs d'absorbance ainsi obtenues sont soustraites des premières valeurs pour la détermination de la concentration des AGNE par courbe d'étalonnage.

2.3.3. Développement de la méthode d'analyse par qPCR

2.3.3.1. Extraction de l'ARN

Pour extraire l'ARN, 500 µL de *TRIzol* (Invitrogen) ont été ajoutés à 100 mg de tissu et homogénéisé à l'aide de l'appareil *PowerGen 700* (Fisher Scientific, ON, Canada) sur glace pendant 15 secondes. Ensuite, 500 µL de *TRIzol* supplémentaire ont été ajoutés à l'homogénat et mélangés par resuspension. L'homogénat a ensuite été incubé à la température ambiante pendant 5 minutes afin de permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Du chloroforme (265 µL) a été ajouté à l'homogénat et les échantillons agités vigoureusement pendant 15 secondes. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 10 minutes à la température ambiante puis centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 g à 4°C. La phase aqueuse a été retirée et 1 000 µL d'isopropanol ont été ajoutés au culot pour précipiter les acides nucléiques. Les échantillons ont ensuite été agités au vortex, puis incubés pendant 10 minutes à la température ambiante, puis centrifugés pendant 10

minutes à 12 000 g à 4°C. Ensuite, 1 000 µL d'alcool éthylique 70% ont été ajoutés pour chaque 750 µL de *Trizol* initial afin d'éliminer les sels, et les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 5 minutes à 7 500 g. Le surnageant éthanolique étant séparé et évaporé à l'air libre, le résidu est ensuite resuspendu dans 85 µL d'eau *RNase free*. La solution obtenue a ensuite été incubée à 55°C pendant 10 minutes. L'absorbance de chaque échantillon a été lue à λ 260 nm et à λ 280 nm et le rapport des absorbances (260 sur 280 nm) a été calculé. Une pureté acceptable d'acides nucléiques présente un rapport entre 1,8 et 2,0. Pour connaître la concentration d'ARN dans la solution, la formule suivante a été utilisée: (absorbance à 260 nm) x 40 (coefficient d'extinction de l'ARN) x facteur de dilution de l'échantillon.

2.3.3.2. Extraction de l'ARN des tissus adipeux

Pour extraire l'ARN du tissu adipeux, l'essai de *Qiagen (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit #74804)* a été utilisé parce que contrairement au *TRIZol*, le mélange de *QIAzol* et de chloroforme est moins miscible aux lipides. À l'étape de séparation des phases, une phase aqueuse rosée avec le *Trizol* a été obtenue ce qui signifiait une contamination par du phénol qui contient des protéines, et possiblement de chloroforme contenant les lipides. Par contre, je ne rencontrais pas ce problème avec l'utilisation du *QIAzol*. Brièvement, 500 µL de *QIAzol* ont été ajoutés à 100 mg de tissu adipeux. Chaque échantillon de tissu a ensuite été homogénéisé avec l'appareil *PowerGen 700* pendant 5 secondes à la vitesse 1 (faible vitesse), 3 secondes à la vitesse 3 (vitesse moyenne), 3 secondes à la vitesse 5 (vitesse élevée), 3 secondes à la

vitesse 3, puis 5 secondes à la vitesse 1 à la température ambiante. Par la suite, 500 μL de *QIAzol* supplémentaires ont été ajoutés, et le lysat a été incubé pendant 5 minutes à la température ambiante. Du chloroforme (300 μL) ont été ajoutés et la suspension, agitée vigoureusement pendant 15 secondes, a ensuite été laissée à la température ambiante pendant 2 minutes. Après une centrifugation de 15 minutes à 12 000 g à 4°C , le surnageant (phase aqueuse) a été transféré dans un nouveau tube dans lequel 1 mL d'alcool isopropylique a été ajouté, avant d'être vortexé et incubé pendant 20 minutes à -80°C afin de précipiter l'ARN (une étape supplémentaire au protocole du fabricant). La suspension a ensuite été décongelée pendant 30 secondes à la température ambiante, vortexée et centrifugée pendant 10 minutes à 12 000 g à 4°C . Ensuite, après élimination du surnageant, 700 μL d'éthanol 70% ont été ajoutés et vortexés. La solution a ensuite été transférée dans une colonne *RNeasy* placée dans un tube de 2 mL et centrifugée pendant 15 secondes à 8 000 g à 22°C . Après élimination de la phase liquide obtenue après centrifugation, 700 μL de tampon RW1 (contient de l'éthanol et du sel) ont été ajoutés dans la colonne *RNeasy* et centrifugés pendant 15 secondes à 8 000 g à 22°C . La solution de lavage étant éliminée, on a procédé à deux autres étapes de lavage avec 500 μL de tampon RPE (contient de l'éthanol) suivi d'une étape de centrifugation de 15 secondes et de 2 minutes respectivement. La colonne *RNeasy* a ensuite été retirée du tube, puis centrifugée de nouveau dans le même tube pendant 15 secondes à 8 000 g à 22°C , afin d'éliminer tout excès de tampon qui pourrait se retrouver entre la colonne et le tube. La colonne *RNeasy* a ensuite été placée dans un tube 1,5 mL, et 25 μL d'eau *RNase free* ont été ajoutées dans la colonne et centrifugées pendant 1 minute à

8 000 g à 22°C. La solution obtenue après centrifugation a été récoltée et repassée sur la même colonne avec centrifugation de 1 minute à 8 000 g à 22°C pour la collecte d'ARN. Une lecture d'absorbance a été effectuée à 260 nm et 280 nm pour chaque échantillon.

2.3.3.3. Transcriptase inverse

Pour éliminer l'ADN génomique contaminant les extraits d'ARN, 1 µg d'ARN (calculé à partir de la mesure de l'absorbance à 260 nm) a été mélangé avec une unité de DNase I dans du tampon Tris (Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, pH 8,4) et complété à 10 µL avec de l'eau *RNase free*. Après 15 minutes, 1 µL d'EDTA 25 mM est ajouté et l'échantillon est chauffé à 65°C pendant 10 minutes. L'ARN a ensuite été converti en ADNc par l'ajout de 200 unités de transcriptase inverse du virus murin de la leucémie de Moloney dans une solution contenant 25 ng/µL d'amorces aléatoires (*random primers*), 10 mM de dithiothréitol, 0,5 mM de déoxynucléoside triphosphate dans un tampon (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, pH 8.3) en incubant le tout à 37°C pendant 2 heures.

2.3.3.4. PCR en temps réel

Pour le qPCR, 1 µL d'ADNc (dilué 1:5) et 0,2 µL de chaque amorce d'une solution-mère à 20 µM ont été ajoutés à 5 µL de *SYBR Green Jumpstart* (Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 7 mM, dNTP 0,4 mM, Taq ADN polymérase

0,05 U/ μ L, anticorps *JumpStart* Taq, *SYBR Green I*, pH 8,3) (Sigma, Saint-Louis, MO, USA), et la solution a été complétée à un volume final de 10 μ L avec de l'eau déionisée (voir tableau I pour les conditions détaillées du qPCR).

Cependant, la majorité des essais finaux ont été réalisés avec le réactif *SsoFast EvaGreen* (Bio-Rad), au lieu du *SYBR Green*, parce qu'on obtient des résultats avec moins de bruit de fond, d'autant plus qu'il coûte moins cher et requiert un temps de réaction total plus court. Brièvement, les conditions expérimentales pour ce réactif étaient les suivantes: 2 μ L d'ADNc (dilué 1:5) et 0,5 μ L de chaque amorce (20 μ M) ont été ajoutés à 10 μ L de *SsoFast EvaGreen* (dNTP, Sso7d-fusion polymérase, MgCl₂, *EvaGreen*, à noter que les concentrations ne sont pas fournies par le fabricant). La solution a été complétée à un volume final de 20 μ L avec de l'eau déionisée (voir tableau II pour les conditions détaillées du qPCR).

Tableau I. Conditions du qPCR avec le *SYBR Green JumpStart*

	Étape	Température (°C)	Temps (s)	Notes
Activation	#1	95	300	
Cycle	#2	95	10	
	#3	60	15	
	#4	72	20	Revenir à l'étape #2 (40X)
Fusion	#5	59	45	
	#6	+1	5	Jusqu'à 95°C

Tableau II. Conditions du qPCR avec le *SsoFast EvaGreen*

	Étape	Température (°C)	Temps (s)	Notes
Activation	#1	95	30	
Cycle	#2	95	5	
	#3	60	20	Revenir à l'étape #2 (40X)
Fusion	#4	59	60	
	#5	+1	5	Jusqu'à 95°C

Les séquences des amorces utilisées et la taille des produits amplifiés correspondants sont comme suit :

Atp5b; amorce sens : 5'- GGTTTCATCCTGCCAGAGACTA-3'

amorce antisens : 5'- AATCCCTCATCGAACTGGACG-3' (120 pb)

β -actine; amorce sens : 5'- ATTACTGCTCTGGCTCCTA-3'

amorce antisens : 5'- TCTGCTGGAAGGTGGACA-3' (125 pb)

Cd36; amorce sens : 5'- GGCCTTACTTGGGATTGG-3'

amorce antisens : 5'- CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA-3' (110 pb)

Cebpa; amorce sens : 5'- AGGTGCTGGAGTTGACCAGT-3'

amorce antisens : 5'- CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3' (224 pb)

Cpt1a; amorce sens : 5'- TGTTGCTCCTGACCATAGGA-3'

amorce antisens : 5'- TGTGCCCAATATTCCTGGAG-3' (164 pb)

Cpt1b; amorce sens : 5'- ATCAAGCCGGTCATGGCACTGG-3'

amorce antisens : 5'- GCGACCTTTGTGGTAGACAGCCA-3' (150 pb)

Dgat2; amorce sens : 5'- GCATCCTCTCAGCCCTCCAAGACA-3'

amorce antisens : 5'- GCCACTCCTAGCACCAGGAAGGAT-3' (124 pb)

Pck1; amorce sens : 5'- CCAGCCAGTGCCCCATTATTGAC-3'

amorce antisens : 5'- TTTGCCGAAGTTGTAGCCGAAGAA-3' (248 pb)

Plin1; amorce sens : 5'- AGTTCACAGCTGCCAATGAG-3'

amorces antisens : 5'- TGCTTGCAATGGGCACACT-3' (165 pb)

Ppara; amorces sens : 5'- TTTGCTGTGGAGATCGGCCTGG-3'

amorces antisens : 5'- TGGTTGCTCTGCAGGTGGAGCTT-3' (100 pb)

Pparg; amorces sens : 5'- GCTGAACGTGAAGCCCATC-3'

amorces antisens : 5'- ACGTGCTCTGTGACGATCTG-3' (150 pb)

Pparg1a; amorces sens : 5'- GGCCCGGTACAGTGAGTGTT-3'

amorces antisens : 5'- GCCCTGAGGACTTGCTGAGTT-3' (101 pb)

Srebf1; amorces sens : 5'- AGCTTCCGGCCTGCTATGAGGA-3'

amorces antisens : 5'- CAGCTGTAGTGCCTCCTTTGCCA-3' (148 pb)

Ucp1; amorces sens : 5'- GACTGGAGGTGTGGCAGTGT-3'

amorces antisens : 5'- AGTGTTGACAAGCTTTCTGTGG-3' (153 pb)

abréviations: *Atp5b*, sous-unité bêta de l'ATP synthase; *Cebpa*, *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*; *Cpt1a*, carnitine palmitoyltransférase 1a forme hépatique; *Cpt1b*, carnitine palmitoyltransférase 1b forme musculaire; *Pck1*, phosphoénolpyruvate carboxykinase 1 cytosolique; *Ppara*, *peroxisome proliferator-activated receptor a;pha*; *Pparg*, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*; *Pparg1a*, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha*; *Srebf1*, *sterol regulatory element-binding transcription factor 1*.

2.3.3.5. Analyse des résultats

Le niveau d'expression relatif des gènes étudiés a été estimé par la méthode comparative des *CT* (*cycle threshold*). La valeur du *CT* correspond au nombre de cycles requis pour produire suffisamment de copies de la séquence amplifiée au cours du qPCR pour atteindre un seuil choisi à l'aide d'une dilution en série de la concentration d'ADNc initiale pour chaque gène testé. La méthode comparative des *CT* nécessite d'abord de faire une validation en comparant l'efficacité de la réaction d'amplification du qPCR entre les gènes d'intérêt et le gène de référence. L'expression du gène de référence ne doit pas être changée par le traitement, et nous avons choisi la bêta-actine comme gène de référence répondant à ce critère. La courbe d'étalonnage était constituée de 8 points, avec les dilutions 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 et 1:500 d'un mélange aléatoire de 10 échantillons d'ADNc. La pente de la régression linéaire du *CT* du gène d'intérêt (auquel on a soustrait la valeur de référence) en fonction du log des dilutions, doit être inférieur à 0,1 afin d'obtenir une efficacité similaire entre le gène d'intérêt et le gène de référence et de pouvoir utiliser la méthode comparative des *CT* pour l'analyse des résultats de qPCR. Si la pente ne correspond pas à ces critères, il faut optimiser la réaction, soit en changeant les conditions du qPCR (cycles, température...), ou en changeant la concentration des amorces, de *SYBR Green* (ou de *SsoFast EvaGreen*) ou du chlorure de magnésium (un cofacteur essentiel pour l'ADN polymérase). La validation de la méthode comparative des *CT* étant effectuée, la valeur *CT* du gène de référence (la *β -actine*) est soustraite du *CT* du gène d'intérêt correspondant de chaque échantillon (ce

résultat est nommé dCT). Nous avons ensuite fait une moyenne des dCT des échantillons du groupe témoin, et cette valeur est soustraite du dCT de chaque échantillon (le résultat nommé $ddCT$). Finalement, nous calculons le 2^{-ddCT} pour chaque échantillon afin d'obtenir l'expression relative du gène d'intérêt par rapport à la moyenne du groupe témoin. Les résultats sont représentés après normalisation des valeurs par la moyenne du groupe témoin (se référer au tableau III pour un exemple de calcul).

Tableau III. Calculs du niveau d'expression du gène *Cebpa* dans le tissu adipeux sous-cutané

Traitement	Ct du gène d'intérêt (<i>Cebpa</i>)	Ct du gène de référence (β -actine)	dCT (Ct de <i>Cebpa</i> - Ct de la β -actine)	$ddCT$ (dCT - moyenne du dCT du groupe témoin)	2^{-ddCT}	Normalisation (2^{-ddCT} / moyenne du 2^{-ddCT} du groupe témoin)
NaCl 0,9%	17.97	13.15	4.82	-0.13	1.09	1.03
NaCl 0,9%	17.22	13.00	4.22	-0.73	1.66	1.57
NaCl 0,9%	17.70	12.27	5.43	0.48	0.72	0.68
NaCl 0,9%	17.84	12.35	5.49	0.54	0.69	0.65
NaCl 0,9%	16.90	12.12	4.78	-0.17	1.13	1.07
			Moyenne du dCT du groupe témoin = 4.95		Moyenne du 2^{-ddCT} du groupe témoin = 1.06	
EP 80317	17.18	13.05	4.13	-0.82	1.77	1.67
EP 80317	17.26	12.74	4.52	-0.43	1.35	1.27
EP 80317	16.78	12.45	4.33	-0.62	1.54	1.45
EP 80317	17.29	12.77	4.52	-0.43	1.35	1.27
EP 80317	17.67	13.35	4.32	-0.63	1.55	1.46

2.4. Western blot

Pour extraire les protéines, 200 mg de gras épидидymaire ont été homogénéisés trois fois pendant 15 secondes dans 500 μ L de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, β -glycérophosphate 20 mM, phényl phosphate 20 mM, glycérol 10%, Triton X-100 1%, leupeptine 1 μ g/mL, pepstatine 1 μ g/mL, antipaïne 2 μ g/mL, orthovanadate de sodium 0,5 mM, inhibiteurs de phosphatases 2 μ g/mL, pH 7,5). La suspension a ensuite été homogénéisée à l'aide d'un pilon en téflon (Tri-R Stir-R S63C, New York, États-Unis) après 10 passages à la vitesse 4. Le tube a été rincé avec 500 μ L de tampon de lyse et la suspension a été soniquée dans un bain glacé deux fois 30 secondes. Les échantillons ont été centrifugés pendant 15 minutes à 15 000 g à 4°C et la phase adipeuse transparente a été aspirée. Cette étape a été répétée deux fois, puis le surnageant a été aspiré et conservé. Les échantillons ont été centrifugés à nouveau pendant 15 minutes à 15 000 g à 4°C, et cette fois-ci, le sous-nageant a été aspiré et conservé.

Le dosage protéique a été effectué par la méthode de l'acide bicinchonique à l'aide d'un spectrophotomètre. Les protéines ont été dénaturées en incubant l'échantillon pendant 5 minutes à 100°C et 100 μ g de protéines par échantillon ont été déposées sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) contenant 10% d'acrylamide et soumis pour la nuit sous une tension électrique de 45

volts. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène PVDF, préalablement trempée dans du méthanol, en imposant un voltage de 50 volts et une température de 4°C pendant 3 heures. Les membranes ont ensuite été soumises à 5 lavages de 5 minutes avec une solution de tampon Tris isotonique (TTBS, *Tween Tris Buffer Saline*) (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4), suivi d'une incubation avec une solution de TTBS contenant 5% de lait en poudre pendant 1 heure à la température pièce. Les membranes ont ensuite été soumises à 5 lavages de 5 minutes dans du TTBS, puis incubées pour la nuit à 4°C avec les anticorps polyclonaux contre la phospho-HSL (ser660) (#4126S, Cell Signaling, dilution finale 1:2 000), la phospho-HSL (ser563) (#4139S, Cell Signaling, dilution finale 1:1 000), la HSL totale (#4107S, Cell Signaling, dilution finale 1:1 000), la phospho-PLIN (substrat phospho-(ser/thr) de la PKA) (#9621, Cell Signaling, dilution finale 1:1 000) ou pendant 2 heures à la température de la pièce avec l'anticorps polyclonal contre la PLIN A (#AB10200, Chemicon, dilution finale 1:1 000) ou l'anticorps monoclonal contre la β -actine (#A2228, Sigma, dilution finale 1:5 000). L'incubation des membranes avec l'anticorps anti-pénilipine A se fait après l'analyse de phospho-PLIN par *stripping* avec la solution (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2% et 2-mercaptoéthanol 88 mM) à 55°C pendant 30 minutes avec agitation à toutes les 5 minutes suivi des étapes de lavage avec du TTBS tel que décrit ci-haut. Les membranes rincées au TTBS, sont incubées pendant 1 heure à la température pièce avec des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort contre les anti-IgG de souris (KPL, MD, États-Unis) ou de lapin (Jackson ImmunoResearch, PA, États-Unis), à une dilution finale de 1 :5 000 (phospho-PLIN) ou de 1 :10 000.

Pour l'analyse des résultats, les membranes ont été incubées pendant 5 minutes avec le réactif *SuperSignal West Dura* (Thermo Scientific, Rockfort, IL, États-Unis) et le signal fluorescent a été lu au ChemiImager 5500 (Alpha Innotech, v2.03). La quantification de l'intensité des bandes a ensuite été mesurée par ImageQuant (Molecular Dynamics, Piscataway, NJ, v5.2) pour la détermination du rapport des formes phosphorylées *versus* les protéines totales.

2.5. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne \pm l'erreur-type de la moyenne. La comparaison entre les groupes a été effectuée par un test *t* de *Student*, ou par une analyse de variance à un facteur, suivi d'un post-test de Bonferroni. Une valeur de $P < 0,05$ a été considérée statistiquement significative.

III. RÉSULTATS

3.1. Effet du EP 80317 sur les dommages myocardiques suivant l'ischémie-reperfusion

Les souris ont été prétraitées avec le EP 80317 ou le NaCl 0,9% pendant 2 semaines et ont ensuite été soumises à une ischémie transitoire (30 minutes) du myocarde par la ligature de l'artère coronaire descendante gauche. La ligature a ensuite été retirée et le cœur reperfusé pour une période de 48 heures. Le groupe prétraité avec le EP 80317 a montré une réduction de la taille de l'infarctus de 34% ($P < 0,05$) (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe) et de TnIc plasmatique (0,0587 ng/mL) de 60% ($P < 0,01$) comparativement au groupe témoin (0,1468 ng/mL) (Figure 3.1A).

De plus, le prétraitement au EP 80317 a diminué le lactate sanguin (2,62 mmol/L), mesuré à 5 minutes de reperfusion suivant l'ischémie de 30 minutes, de 20% ($P < 0,01$) comparativement au groupe témoin (3,28 mmol/L) (Figure 3.1B).

3.2. Effet du EP 80317 sur les concentrations plasmatiques des AGNE

La réduction de la taille de l'infarctus chez les souris soumises à une I/R du myocarde a été accompagnée par une diminution des taux d'AGNE circulants de 33%

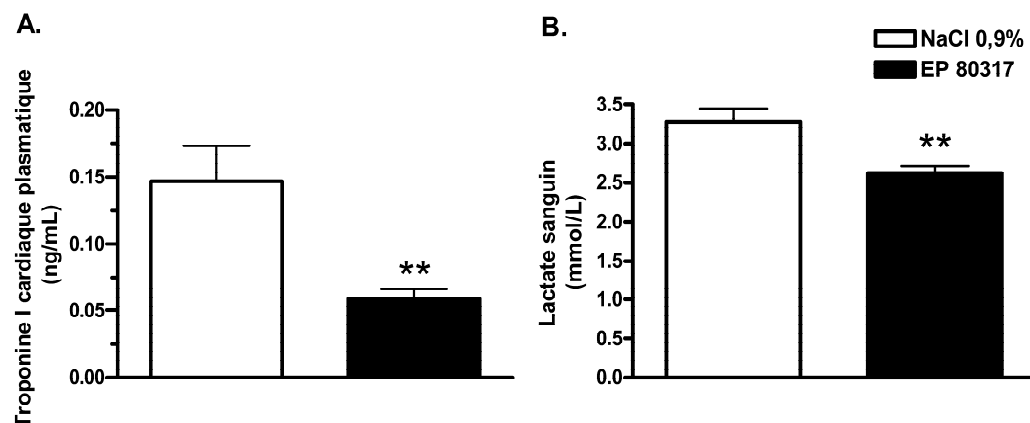


Figure 3.1. Le EP 80317 diminue les dommages au coeur suite à une I/R du myocarde.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 6-9 souris par groupe (TnIc) et de 5 souris par groupe (lactate sanguin).

($P < 0,001$) chez le groupe prétraité au EP 80317 (0,34 nmol/L) comparativement au groupe témoin (0,49 nmol/L) à 6 heures suivant la reperfusion (Figure 3.2).

À 48 heures de reperfusion, les taux d'AGNE circulants étaient revenus aux valeurs basales chez les souris ayant subi une I/R (0,11 nmol/L). Le traitement par le EP 80317 n'a pas modulé les concentrations d'AGNE à 48 heures (0,10 nmol/L) (Figure 3.2). Les concentrations d'AGNE en circulation des groupes témoin et traité,

à 48 heures de reperfusion, sont significativement plus faibles que celles du groupe témoin à 6 heures de reperfusion (88%, $P < 0,001$).

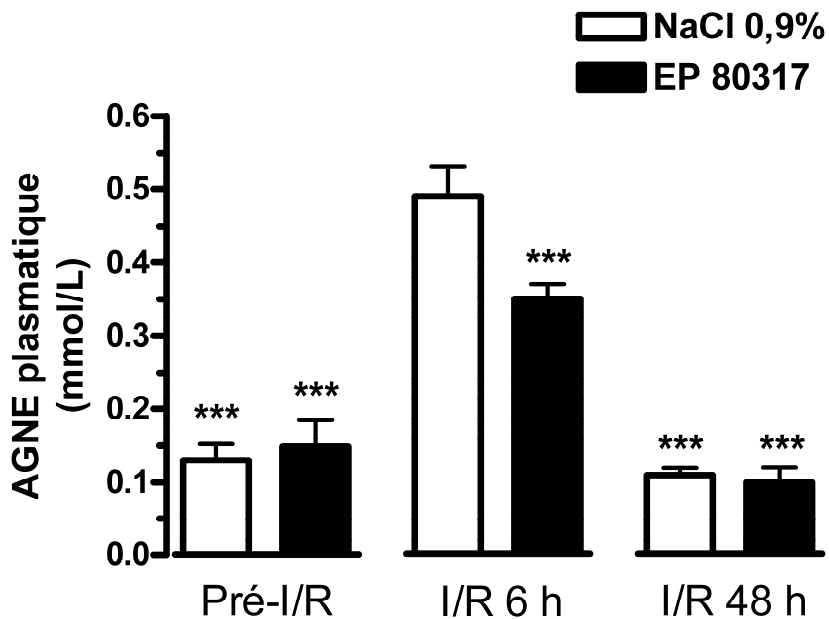


Figure 3.2. Le EP 80317 diminue la concentration circulante des AGNE à 6 heures, mais pas à 48 heures post-reperfusion.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 5-6 souris par groupe.

3.3. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux à 6 heures post-reperfusion

Afin d'expliquer la réduction des AGNE circulants chez le groupe traité par le EP 80317, nous avons étudié l'effet du traitement sur le tissu adipeux, l'organe responsable de la relâche des AGNE en circulation. Nous avons mesuré l'expression de quelques gènes cibles impliqués dans les fonctions d'adipogénèse, du transport des acides gras, de la thermogénèse, de l'oxydation des acides gras, de la synthèse et du stockage des TG. Ces expériences ont été faites sur trois types de tissu adipeux différents : épидидymaire, périrénal et sous-cutané.

3.3.1. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux épидидymaire à 6 heures post-reperfusion

Le prétraitement par le EP 80317 a réduit le niveau d'expression d'ARNm de *Cpt1b* par un facteur de 1,3 fois ($P < 0,05$) (Figure 3.3.1A), tandis que le niveau d'expression d'ARNm des gènes *Dgat2* et *Plin1* est augmenté par un facteur de 1,5 fois ($P < 0,05$), et de la *Pck1* par un facteur de 1,7 fois ($P < 0,05$) comparativement au groupe témoin (Figure 3.3.1 B). Aucun changement du niveau d'expression des autres gènes étudiés, incluant *Pparg*, *Ppargc1a*, *Ucp1*, *Atp5b* et *Cd36*, n'a été observé au niveau du tissu adipeux épидидymaire (Figure 3.3.1A et B).

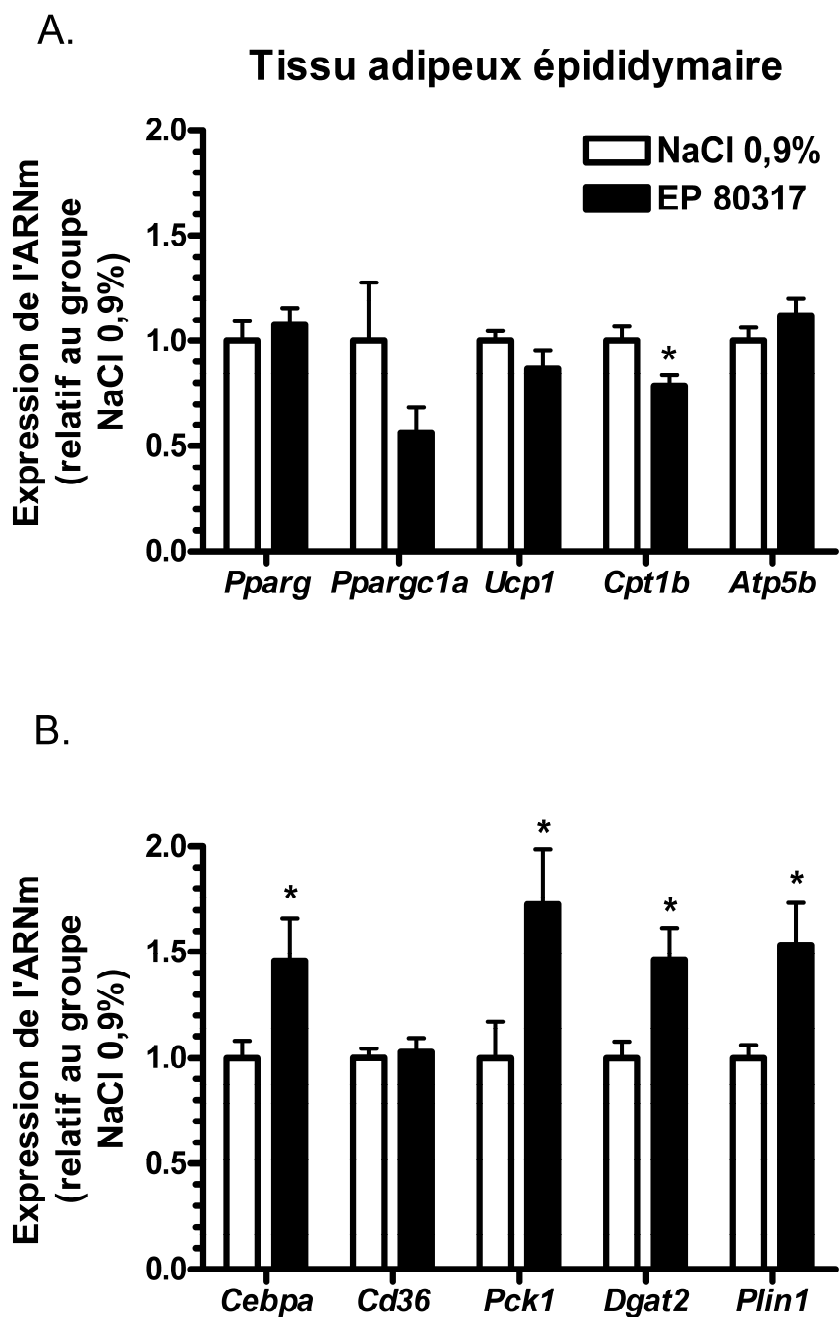


Figure 3.3.1. Le EP 80317 augmente l'expression des gènes responsables du stockage des triglycérides au niveau du tissu adipeux épидидymaire à 6 heures de reperfusion.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 7-8 souris par groupe.

3.3.2. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux périrénal à 6 heures post-reperfusion

Un prétraitement par le EP 80317 n'a pas changé l'expression des gènes cibles impliqués dans l'adipogénèse, la thermogénèse, le transport et le métabolisme des acides gras au niveau du tissu adipeux périrénal (Figure 3.3.2).

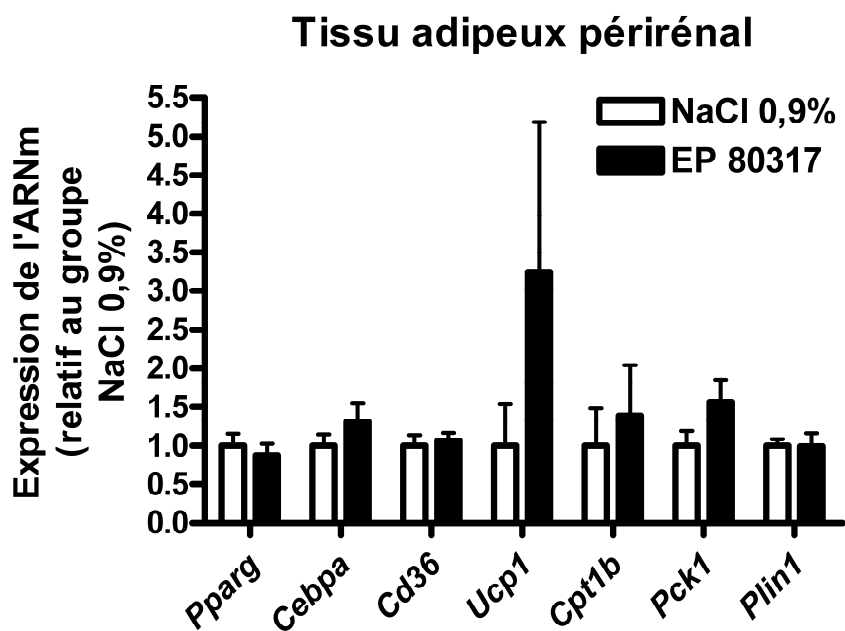


Figure 3.3.2. Aucun changement d'expression des gènes étudiés n'a été induit par un prétraitement par le EP 80317 au niveau du tissu adipeux périrénal.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 5 souris par groupe.

3.3.3. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux sous-cutané à 6 heures post-reperfusion

Un prétraitement par le EP 80317 a augmenté l'expression du gène *Cebpa* de 1,4 fois ($P < 0,05$) par comparaison aux souris traitées par le véhicule. Une tendance similaire a été observée pour la *Plin1* ($P = 0,06$) (Figure 3.3.3). Aucun changement de l'expression des autres gènes étudiés n'a été observé au niveau du tissu adipeux sous-cutané.

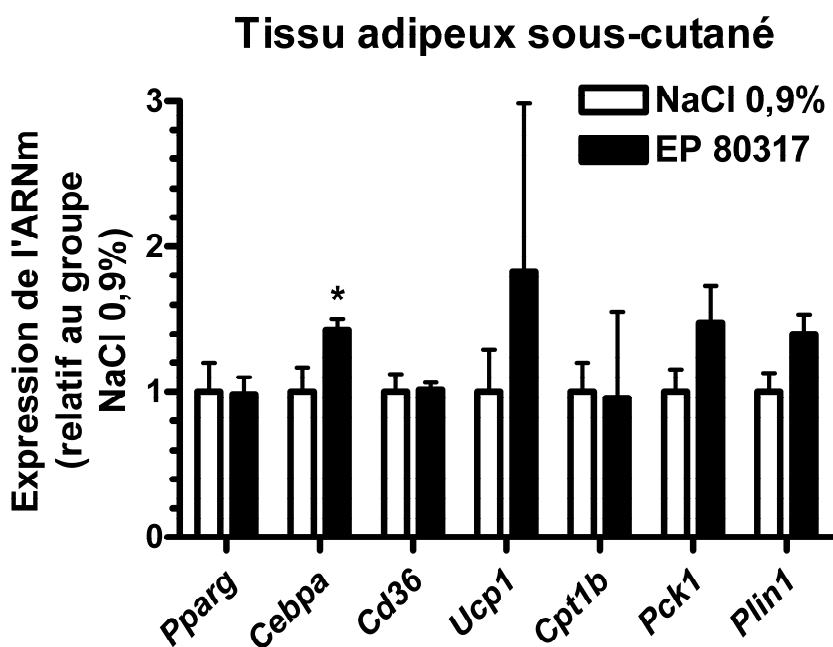


Figure 3.3.3. Le EP 80317 a augmenté de façon significative le niveau d'expression du gène adipogénique *Cebpa* au niveau du tissu adipeux sous-cutané.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 5 souris par groupe.

3.4. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du ventricule gauche à 6 heures post-reperfusion

Un prétraitement par le EP 80317 n'a pas affecté l'expression des gènes étudiés, impliqués dans le métabolisme, le transport et l'oxydation des acides gras au niveau du ventricule gauche (Figure 3.4).

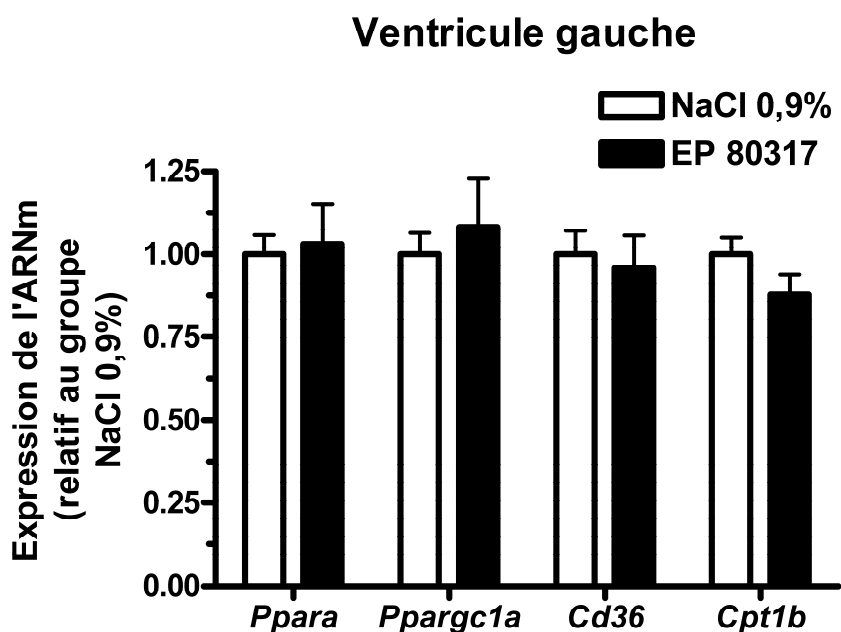


Figure 3.4. Aucun changement de l'expression des gènes étudiés n'a été observé après un prétraitement par le EP 80317 au niveau du ventricule gauche.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 5 souris par groupe.

3.5. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du muscle gastrocnémien à 6 heures post-reperfusion

Un prétraitement par le EP 80317 n'a pas modulé l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme, le transport et l'oxydation des acides gras au niveau du muscle gastrocnémien (Figure 3.5).

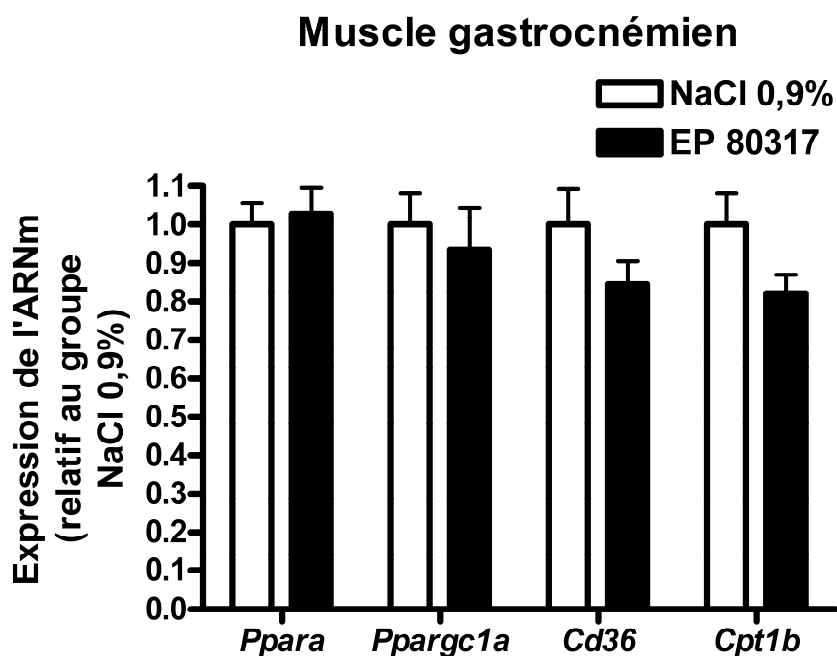


Figure 3.5. Aucun changement de l'expression des gènes étudiés n'a été observé après un prétraitement par le EP 80317 au niveau du muscle squelettique.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 5-7 souris par groupe.

3.6. Effet du EP 80317 sur l'expression génique hépatique à 6 heures post-reperfusion

Nous n'avons noté aucun changement dans l'expression des gènes impliqués dans le transport ou la synthèse *de novo* des acides gras, *Srebf1*, au niveau du foie, mais l'expression du gène *Cpt1a* a été augmentée de 1,5 fois ($P < 0,05$) par rapport au groupe témoin (Figure 3.6).

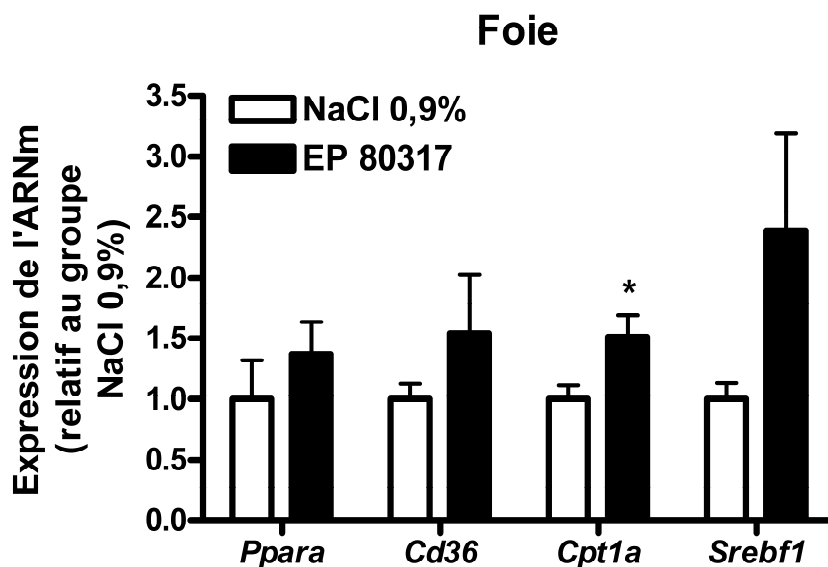


Figure 3.6. Un prétraitement par le EP 80317 a augmenté l'expression du gène *Cpt1a* au niveau du foie.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 4-5 souris par groupe.

3.7. Effet du EP 80317 sur l'expression génique au niveau du tissu adipeux épидидymaire à 48 heures post-reperfusion

Le niveau d'expression des gènes a été déterminé après 48 heures de reperfusion, afin de vérifier si les effets du EP 80317 étaient encore présents. Nous n'avons observé aucune modulation du niveau d'expression des gènes étudiés entre les groupes témoins et traités (Figure 3.7).

3.8. Effet du EP 80317 sur la lipolyse au niveau du tissu adipeux épидидymaire

L'état de phosphorylation des protéines impliquées dans la lipolyse au niveau du gras épидидymaire a été mesuré par *Western blot*. À 6 heures de reperfusion du cœur ischémié, nous n'avons pas observé de différence dans le niveau relatif de phosphorylation de la HSL (ser660 et ser563), ou de la PLIN entre le groupe traité par le EP 80317 et le groupe témoin.

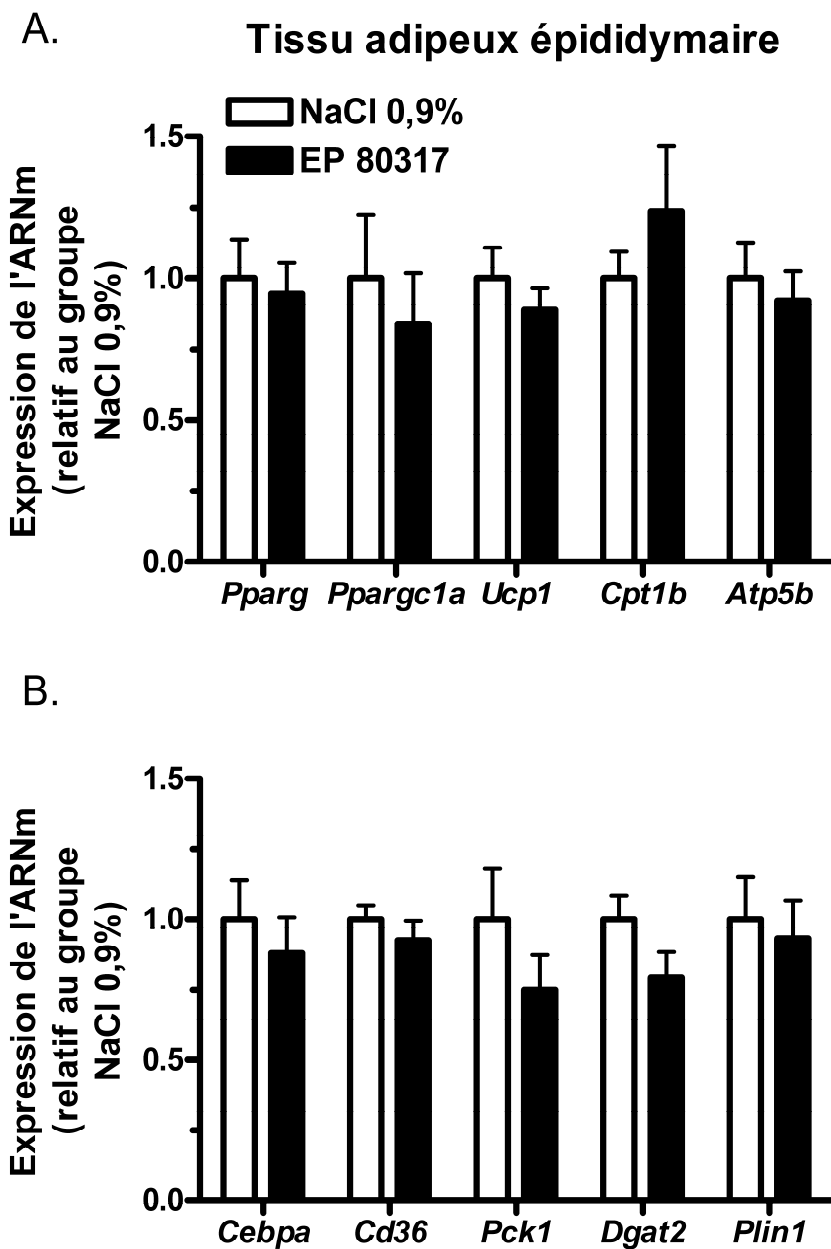


Figure 3.7. Un prétraitement par le EP 80317 n'a pas affecté l'expression des gènes étudiés au niveau de la graisse épидидymaire à 48 heures post-reperfusion.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 7-8 souris par groupe.

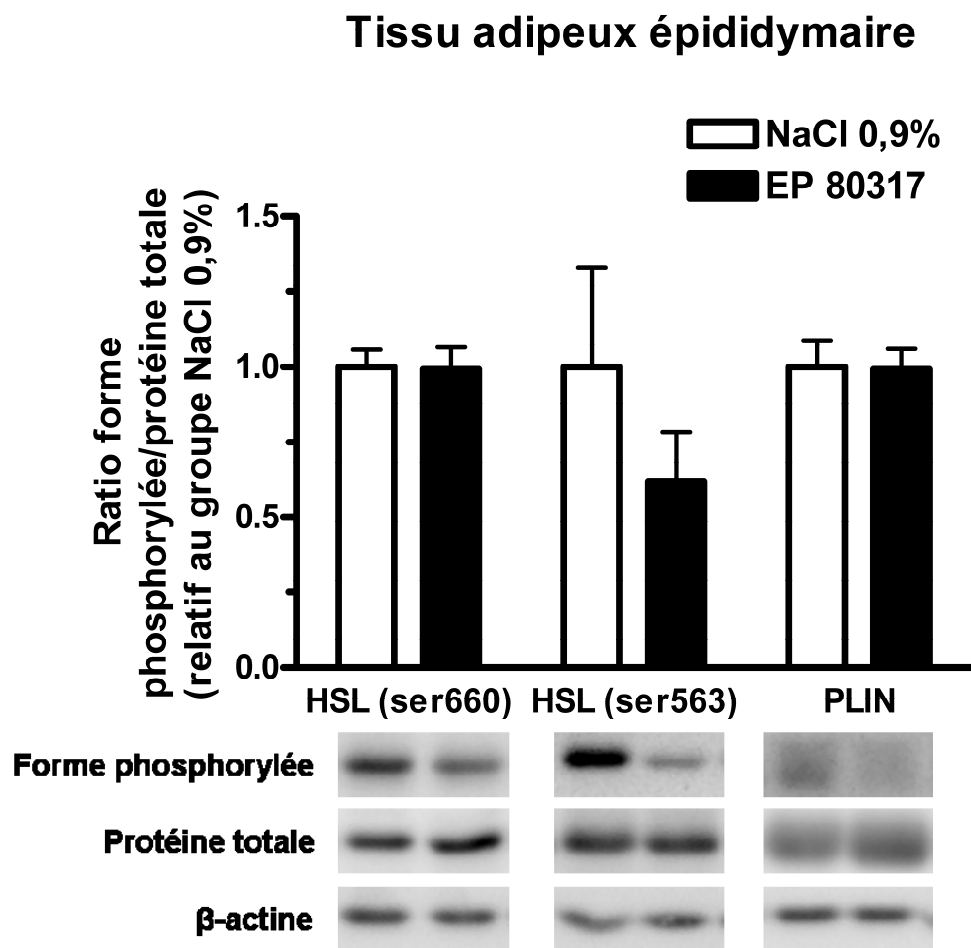


Figure 3.8. Un prétraitement par le EP 80317 n'a pas affecté l'activité lipolytique de la HSL et de la PLIN au niveau du tissu adipeux épидидymaire.

Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 8 souris par groupe.

IV. DISCUSSION

4.1. Considérations méthodologiques

Afin d'étudier les effets cardioprotecteurs du EP 80317 au niveau des tissus périphériques, nous avons considéré l'utilisation de différentes techniques dont le qPCR, l'immunobuvardage, ou la puce à ADN (*DNA microarray*). Chaque technique offre des avantages uniques, mais chacune possède aussi ses propres limitations.

La puce à ADN est un outil très puissant qui permet de dépister le niveau d'expression de plusieurs gènes simultanément. Cependant, en plus d'être relativement coûteuse, cette technique demeure semi-quantitative (Hsieh *et al.*, 2001). De plus, pour notre étude, nous pouvions cibler les gènes potentiellement impliqués dans une voie responsable de la réduction des AGNE en circulation après un prétraitement par le EP 80317.

Nous avons choisi de mesurer les niveaux d'ARNm des gènes cibles par qPCR plutôt que de mesurer l'expression protéique par immunobuvardage pour l'analyse de nos résultats, considérant principalement le coût et de la possibilité de mesurer plusieurs cibles avec une quantité limitée de tissu.

Une des limitations de la technique du qPCR est que la modulation du niveau d'expression des gènes ne corrèle pas nécessairement avec le niveau d'expression des

protéines. Par exemple, le groupe de Allred *et al.* (2011) a montré que le niveau d'ARNm du CD36 dans le tissu adipeux ne corrèle pas bien avec son expression protéique. Cette dissociation pourrait être expliquée par la modulation post-traductionnelle possible du CD36 par le glucose (Griffin *et al.*, 2001). De plus, le CD36 est compartimenté dans des vésicules de stockage (Bezaire *et al.*, 2006) et peut fusionner avec sarcolemme ou à la membrane mitochondriale après stimulation des cellules par l'insuline (Luiken *et al.*, 2002) ou par la contraction musculaire via la stimulation de l'AMPK (Koonen *et al.*, 2005). Ainsi, déterminer le niveau d'expression protéique ou génique du CD36 dans un homogénat tissulaire apporte une information limitée.

La détermination de l'expression génique par qPCR présente aussi d'autres limitations. Par exemple, on ne peut pas mesurer l'état de phosphorylation, qui détermine si la protéine est dans son état actif ou inactif. C'est pourquoi il est fréquent de mesurer à la fois l'expression des gènes et celle des protéines par qPCR et par immunoblot respectivement.

Notre protocole expérimental incluait une période fixe d'ischémie de 30 minutes, capable d'induire un infarctus représentant environ 30% de la superficie totale du ventricule gauche après une période de reperfusion de 48 heures. Nous avons aussi étudié deux périodes de reperfusion, l'une précoce, 6 heures après le début de la reperfusion et l'autre à 48 heures de reperfusion pour estimer l'étendue de

la zone infarctée. Des résultats antérieurs avaient montré que 6 heures de reperfusion résultait en une augmentation significative de la phosphorylation de l'AMPK et d'Akt au niveau du ventricule gauche, tandis qu'une réduction de la zone infarctée était observée à 48 heures de reperfusion après un traitement de 14 jours avec le EP 80317 (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe).

4.2. Effet du EP 80317 sur le cœur

Plusieurs études ont montré que l'hormone de croissance (HC), le facteur de croissance apparenté à l'insuline (IGF-1, pour *insulin-like growth factor*), et les sécrétagogues endogènes (ghréline) et synthétiques de l'HC, dont le prototype est l'hexaréline, exercent des effets cardioprotecteurs après une I/R du myocarde (Davani *et al.*, 2003; Nagaya *et al.*, 2001; Tivesten *et al.*, 2000). L'équipe du Dr. Ong a découvert que l'hexaréline, un ligand du récepteur des sécrétines de l'HC (GHSR-1a, *growth hormone secretagogue receptor type 1a*), lie aussi le récepteur CD36 au niveau de la membrane plasmique des cardiomyocytes (Bodart *et al.*, 2002). Le groupe de Febbraio *et al.* (1999) avait montré l'importance du rôle du CD36 à faciliter l'internalisation des AGE et leur métabolisme dans le cœur (Coburn *et al.*, 2000). Nous avons donc utilisé le EP 80317 dans notre étude d'I/R du cœur, un peptide qui se lie au CD36, mais pas au GHSR-1a (Marleau *et al.*, 2005) afin d'investiguer les effets cardioprotecteurs d'un ligand sélectif du CD36 indépendamment de la sécrétion de l'HC.

Une étude a montré que le cœur isolé des souris déficientes en CD36, soumis à une ischémie globale de 18 minutes suivie d'une reperfusion de 40 minutes, récupère aussi bien que les cœurs de souris de type sauvage. En effet, les cœurs des souris déficientes en CD36 compensent la diminution d'oxydation des acides gras par une oxydation accrue de glucose pour fournir de l'ATP (Kuang *et al.*, 2004). Par contre, le rôle du CD36 dans le métabolisme énergétique du cœur reste peu connu. Nous nous sommes donc intéressés à cibler le CD36 par une approche pharmacologique. Nos études sur un modèle d'I/R du myocarde chez la souris ont montré les effets bénéfiques du prétraitement par le EP 80317, un ligand sélectif du CD36. Nos résultats ont montré qu'une administration quotidienne de EP 80317 à une dose de 300 µg/kg (289 nmol/kg) pendant 14 jours a réduit la taille de l'infarctus de 34% ($P < 0,05$) (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe). Cette réduction de la taille de l'infarctus induite par le traitement au EP 80317 est accompagnée par une diminution des concentrations plasmatiques de la TnIc (Figure 3.1), une sous-unité du complexe de troponine qui inhibe l'interaction entre les myofilaments d'actine et de tropomyosine dans la contraction musculaire (Solaro et Rarick, 1998). La TnIc est un biomarqueur d'intégrité cellulaire utilisé en clinique pour détecter un infarctus du myocarde parce qu'elle atteint un seuil facilement détectable après 4 à 6 heures suivant une ischémie du myocarde suite une protéolyse partielle par des protéases dépendantes du calcium (Di Chiara *et al.*, 2010; Tanasijevic *et al.*, 1999; Venturini *et al.*, 2009). Un autre paramètre appuyant une réduction du dommage cardiaque est la réduction de lactate

sanguin dans les premières minutes suivant la reperfusion dans le groupe prétraité au EP 80317 comparativement au groupe témoin (Figure 3.1). En effet, la quantité de lactate accumulée par la transformation du pyruvate dans les cardiomyocytes pendant l'ischémie dépend de la durée et de l'intensité de l'hypoxie (Stanley *et al.*, 1997). À la reperfusion, l'apport massif d'oxygène cause des dommages métaboliques conduisant à la libération et à une augmentation de la concentration du lactate dans la circulation sanguine durant les premières minutes seulement, puisqu'il sera rapidement utilisé et métabolisé par d'autres tissus, reflétant ainsi le taux de lactate cardiaque et les changements métaboliques associés à une acidification du milieu intracellulaire conduisant à une dysfonction cardiaque (Lin et Suleiman, 2003).

Afin de documenter l'effet du prétraitement pharmacologique sur le niveau d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme cardiaque, nous avons mesuré l'expression du gène de PPAR α qui est un récepteur nucléaire régulant la transcription de gènes responsables de l'oxydation des acides gras (Lehman *et al.*, 2000). Par exemple, l'expression du CD36 et de la FABP qui régulent le captage des acides gras et de la CPT1 et de la malonyl-CoA décarboxylase qui régulent la β -oxydation mitochondriale, sont tous régulés positivement par PPAR α (Djouadi *et al.*, 1998; Djouadi *et al.*, 1999; Motojima *et al.*, 1998; Van Der Lee *et al.*, 2000). À l'opposé, le PPAR α régule négativement l'expression de certains gènes qui sont responsables du transport et de l'oxydation du glucose, tels que le GLUT-4, l'HK II et le glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Van Der Lee *et al.*,

2000). Nos résultats ont montré qu'un prétraitement par le EP 80317 n'induit pas de changement du niveau d'expression de *Ppara* dans le groupe traité au EP 80317, ni des gènes régulés par ce dernier, tels que le *Cd36* et la *Cpt1b*. De plus, l'expression du gène co-activateur de PPAR- γ (*Ppargc1a*, PPAR- γ coactivator) un co-activateur qui se lie au complexe des récepteurs nucléaires X aux rétinoïdes (RXR)-PPAR, aussi impliqué dans la co-transcription des enzymes mitochondriales liés à l'oxydation des acides gras (Lehman *et al.*, 2000; Vega *et al.*, 2000), n'est pas modulé par le prétraitement au EP 80317 (Figure 3.4).

Nos résultats sont en accord avec les résultats d'études métaboliques réalisées par imagerie du cœur par la technique de μ -TEP. En effet, nous avons montré que bien que la vitesse d'extraction du F¹⁸-FTHA, un analogue des AGLC, n'est pas changée après un prétraitement par le EP 80317, la quantité globale internalisée est diminuée. Ces résultats suggèrent que la fonction des transporteurs d'acides gras au niveau du cœur n'est pas modulée par le prétraitement au EP 80317, et que la réduction du captage global d'AGN fait suite à la réduction des concentrations d'AGNE systémiques. Ainsi, la diminution du métabolisme oxydatif des acides gras au niveau cardiaque chez les souris traitées au EP 80317 contribuerait à la cardioprotection observée.

Outre les concentrations circulantes d'AGNE, nous avons mesuré la glycémie, la concentration sanguine en lactate, les concentrations plasmatiques d'insuline, de

TG, de catécholamines et de la TnIc. La réduction du lactate sanguin dans les minutes suivant la reperfusion, ainsi que celle des concentrations plasmatiques de TnIc à 48 heures post-reperfusion corrélient avec la réduction de la taille de l'infarctus. Bien que le prétraitement par EP 80317 n'a pas changé de façon significative les concentrations d'insuline et de catécholamines, les résultats de l'étude de cinétique après la perfusion jusqu'à l'état d'équilibre du palmitate marqué au C¹⁴ (C¹⁴-palmitate) ont montré une réduction de la lipolyse *in vivo* chez les souris traitées par le EP 80317 (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe). Toutes les expériences ont aussi été réalisées chez des souris déficientes en CD36 et nous n'avons observé, entre autres, aucune différence significative des taux plasmatiques des AGNE à 6 heures de reperfusion, ni de la taille de l'infarctus à 48 heures de reperfusion entre le groupe prétraité au EP 80317 comparativement au groupe témoin (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe). L'ensemble de ces observations démontre que les effets cardioprotecteurs observés par un prétraitement avec le EP 80317 sont dépendants de l'expression du CD36.

En résumé, aucune modulation du profil des gènes impliqués dans la capture et le métabolisme des acides gras au niveau du cœur, dont *Ppara*, *Ppargc1a*, *Cd36* et *Cpt1b*, n'est observée chez les souris prétraitées par le EP 80317, suggérant que le EP 80317 ne module pas, du moins directement, l'expression des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras au niveau cardiaque.

4.3. Effet du EP 80317 sur le tissu adipeux

Tel que décrit précédemment, le prétraitement par le EP 80317 n'a pas changé la vitesse d'extraction cardiaque des AGNE, ni les niveaux d'expression du gène du CD36, cependant a induit une réduction de l'internalisation globale des AGNE au niveau du cœur. Cette observation était associée à une diminution transitoire d'AGNE systémique dans le groupe traité au EP 80317 (Figure 3.2). Ces observations nous ont conduits à documenter les effets d'un prétraitement systémique avec le EP 80317 sur les niveaux d'expression de gènes adipocytaires, le tissu adipeux étant un organe dont la fonction principale est de réguler la sécrétion d'acides gras libres en circulation.

Toutefois, le tissu adipeux se retrouve dans différentes régions du corps, et sa fonction et son phénotype peuvent différer selon sa localisation (Altintas *et al.*, 2011). D'une part, dans la cavité abdominale, on retrouve le tissu adipeux gonadique qui est attaché à l'épididyme chez les mâles, le tissu adipeux périrénal qui est retrouvé autour des reins, le tissu adipeux mésentérique au niveau des intestins, et le tissu adipeux de l'épiploon retrouvé proche de l'estomac et de la rate. Ces deux derniers représentent une très faible portion du tissu adipeux et sont moins étudiés (Altintas *et al.*, 2011). D'autre part, le tissu adipeux sous-cutané est retrouvé dans des parties plus superficielles. Chez la souris, il se retrouve sous la peau en longeant les parois des côtés de la cavité péritonéale, tandis que chez l'humain, il se retrouve plutôt au niveau des hanches, des cuisses et des fesses. Le tissu adipeux abdominal a été

associé avec les risques de maladies métabolique et cardiovasculaire, comparativement au tissu adipeux sous-cutané (Giorgino *et al.*, 2005). Comme l'expression des gènes et des protéines peut différer entre les différents dépôts de tissus adipeux (Yamamoto *et al.*, 2010), nous avons étudié l'expression des gènes ciblés au niveau de trois dépôts de tissu adipeux: épидидymaire, périrénal et sous-cutané.

Dans une étude précédente, Rodrigue-Way *et al.* (2007) ont montré qu'un traitement avec l'hexaréline, un agoniste non sélectif des récepteurs CD36 et GHS-R1a, augmente l'expression des gènes et des protéines qui jouent un rôle dans l'oxydation des acides gras, tels que la PGC-1 α , la F₁-ATPase et l'UCP1 au niveau du tissu adipeux épидидymaire chez la souris de manière dépendante de l'expression du CD36; ces effets étaient absents chez les souris déficientes en CD36. Ces marqueurs sont spécifiques au tissu adipeux brun, suggérant un changement de phénotype du tissu adipeux blanc en tissu adipeux brun, un phénomène qui a initialement été découvert chez les rongeurs (Ghorbani et Himms-Hagen, 1997) et qui implique l'activation du facteur de transcription PRDM16 (*PR domain containing 16*) qui à son tour active PGC-1 α et PPAR- γ . Ceci aura comme conséquence d'augmenter la transcription des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale (Seale *et al.*, 2009). En effet, les adipocytes bruns sont caractérisés par un nombre important de mitochondries qui sont larges et possèdent un espace inter-membranaire très compacté, ce qui explique leur fonction métabolique oxydative et thermogénique très

élevée (Saely *et al.*, 2012). Nous avons donc déterminé, dans un premier temps, l'effet d'un prétraitement par le EP 80317 sur le niveau d'expression des gènes *Pparg*, *Ppargcla* et de leurs gènes cibles *Ucp1* et *Cpt1b*. Le changement de phénotype du tissu adipeux blanc en tissu adipeux brun aurait pu se traduire par la diminution des taux circulants des AGNE avec une oxydation accrue de ces derniers par les adipocytes bruns et la relâche de l'énergie sous forme de chaleur. Toutefois, nos résultats ont montré une absence de modulation du niveau d'expression des gènes *Ppargcla* et *Ucp1* dans les tissus adipeux du groupe prétraité au EP 80317 par comparaison au groupe témoin. De plus, nous avons observé une réduction transitoire du niveau d'expression du gène *Cpt1b* dans le tissu adipeux épидидymaire après 6 heures de reperfusion du cœur ischémié. Ainsi, les effets d'un prétraitement par le EP 80317, un agoniste sélectif du récepteur du CD36, et ceux de l'héxaréline, un ligand non sélectif, diffèrent au niveau du tissu adipeux. Tandis que l'héxaréline semble stimuler le changement de phénotype des adipocytes blancs en adipocytes bruns et accélérer l'oxydation des acides gras, le EP 80317 n'induit pas ces effets. Rodrigue-Way *et al.* (2007) ont montré que ce changement phénotypique était dépendant du CD36 en utilisant des souris déficientes en CD36, mais les souris dans cette étude avaient été traitées pendant 12 semaines avec l'héxaréline. Nos études ayant été réalisées avec un prétraitement de 14 jours avec le EP 80317, il nous faudrait effectuer une étude additionnelle avec un traitement prolongé avec le EP 80317 afin d'évaluer si le traitement induit un changement de phénotype d'adipocytes blancs en adipocytes bruns.

Nous avons ensuite étudié le profil des gènes responsables du stockage des acides gras au niveau du tissu adipeux. Parmi les gènes ciblés, nous nous sommes intéressés à *Pck1*, *Dgat2*, *Plin1* et *Cebpa*. *Pck1* est une protéine non modifiée de façon post-transcriptionnelle responsable de la glycéronéogenèse, signifiant que son activité est proportionnelle à l'expression de l'ARNm (Cadoudal *et al.*, 2008). *Dgat2* est responsable de la dernière estérification d'acide gras dans la synthèse des TG (Harris *et al.*, 2011). *Plin1* est protéine qui stabilise les gouttelettes lipidiques (Brasaemle, 2007) et *Cebpa* est un facteur de transcription régulant, entre autres, la transcription de *Pck1* (Jurado *et al.*, 2002). Nous avons observé une augmentation de l'ARNm de ces 4 gènes dans le tissu adipeux épидидymaire, et une augmentation de *Cebpa* au niveau du tissu adipeux sous-cutané dans le groupe traité au EP 80317 soumis à une ischémie transitoire du myocarde et une reperfusion de 6 heures. Le EP 80317 agirait donc de façon similaire aux TZD en diminuant la concentration plasmatique des AGNE en stimulant la glycéronéogenèse et l'estérification des acides gras (Cadoudal *et al.*, 2005). Cependant, contrairement aux TZD, le EP 80317 ne module pas l'expression de *Pparg* ni du *Cd36* au niveau du tissu adipeux (Figures 3.3 à 3.7) et (Avallone *et al.*, 2006) et n'induit pas de stéatose hépatique apparente (Marleau *et al.*, 2005). Bien que nous aurions pu nous attendre à une augmentation de l'expression du CD36 adipocytaire et à une augmentation du transport des acides gras en prévision du stockage des TG, nos observations suggèrent un effet du

prétraitement sur l'inhibition transitoire de la lipolyse et de l'activation de la glycéronéogénèse (Figure 3.3.1).

Étant donné la diminution des AGNE plasmatiques et l'augmentation du stockage des TG au niveau du tissu adipeux chez les souris prétraitées par le EP 80317, nous nous attendions à une diminution de la lipolyse et d'une réduction de l'hydrolyse des TG suivie de la libération des AGNE dans la circulation systémique (Nishino *et al.*, 2007). Nous avons mesuré le degré d'activation de la HSL et de la PLIN par la PKA. Nos résultats n'ont pas montré de différence de l'état de phosphorylation de la HSL et de la PLIN dans le tissu épидидymaire des souris traitées à 6 heures de reperfusion post-infarctus par comparaison au groupe témoin (Figure 3.8). Cette observation pourrait résulter du fait que la lipolyse est étroitement régulée par ses activateurs et ses inhibiteurs (Martin *et al.*, 2009), et nos résultats ont montré qu'il n'y a pas de différence significative des concentrations plasmatiques moyennes des catécholamines, ni de l'insulinémie, à 6 heures de reperfusion post-infarctus (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe). Toutefois, les études de perfusion du C¹⁴-palmitate à l'état d'équilibre ont montré une réduction de la lipolyse chez les souris traitées par le EP 80317, en absence d'une modification de la clairance systémique du palmitate radiomarqué et par la réduction des taux d'apparition d'AGNE 6 heures après la reperfusion du cœur ischémié (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe). Nos résultats suggèrent un effet inhibiteur partiel du EP 80317 sur la lipolyse stimulée, comme dans le cas présent, suivant un infarctus du myocarde. À l'appui, un

traitement de 14 jours avec le EP 80317 n'a pas modifié les taux circulants d'AGNE chez les souris avant l'ischémie (Figure 3.3). Une alternative à l'essai de phosphorylation de la HSL par *Western blot* aurait pu être de déterminer l'activité de l'AMPK qui induit une inhibition de la lipolyse par phosphorylation de sérine 565 de la HSL (Garton *et al.*, 1989). De façon intéressante, nos résultats antérieurs avaient montré une augmentation transitoire de l'activation de l'AMPK au niveau du tissu cardiaque 6 heures après le début de la reperfusion du cœur ischémié chez les souris traitées au EP 80317 (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe).

4.4. Effet du EP 80317 sur les autres tissus périphériques

Nous avons aussi étudié les effets du EP 80317 sur l'expression de certains gènes dans le muscle squelettique et le tissu hépatique qui sont aussi des organes utilisateurs d'acides gras. En effet, dans les conditions où la concentration d'AGNE circulante est élevée, si le tissu adipeux ne parvient pas à réguler les concentrations d'AGNE, l'excès s'accumule dans le muscle squelettique et le foie (Jeong *et al.*, 2011). Notre objectif était de déterminer si ces deux tissus contribueraient à la diminution des AGNE en circulation (Shi et Cheng, 2009) chez les souris traitées par le EP 80317. Au niveau du muscle squelettique, les acides gras sont stockés sous forme de TG et servent de réserve d'énergie (Watt, 2009). Cependant, ces derniers

peuvent facilement surcharger le muscle, en particulier lors d'une augmentation prolongée d'AGNE plasmatiques et mener à la lipotoxicité. Nos résultats n'ont pas montré de différence d'expression d'ARNm des gènes de *Pparg*, *Pparg1a*, *Cd36* et *Cpt1b* dans le tissu musculaire squelettique à 6 heures de reperfusion du cœur ischémié entre les groupes traités par le EP 80317 ou le véhicule (Figure 3.5). Ces résultats suggèrent que le prétraitement par le EP 80317 n'altère pas le métabolisme, le transport et l'oxydation des acides gras au niveau du muscle squelettique gastrocnémien. Il aurait été intéressant d'investiguer les effets du prétraitement au niveau du muscle soleus, un muscle rouge formé de fibres à contractions lentes, comparativement au muscle gastrocnémien qui est un muscle blanc formé de fibres à contractions rapides (Levin *et al.*, 2007). En effet, le groupe de Chabowski *et al.* (2006) a montré chez le rat que le muscle soleus est plus susceptible d'internaliser les AGNE lors d'une augmentation plasmatique des acides gras comparativement au muscle gastrocnémien.

Le foie est un organe capable de faire la synthèse *de novo* des acides gras de même que leur oxydation, de synthétiser des TG et de les relâcher dans la circulation. Nos résultats ont montré une augmentation de l'expression du gène de *Cpt1a*, ce qui suggère une augmentation de l'oxydation des acides gras dans le foie. Toutefois, notre observation du niveau d'expression de l'ARNm de *Srebf1*, qui encode les facteurs de transcription SREBP-1a (*sterol regulatory element binding protein*) et SREBP-1c, dont SREBP-1c est l'isoforme prédominante au niveau du foie

(Shimomura *et al.*, 1997), suggère qu'il y a possiblement une certaine activité de DNL. Pour connaître l'effet prédominant induit par le prétraitement au EP 80317, nous pourrions déterminer l'état de phosphorylation d'ACC1 et ACC2. Si ces enzymes ne sont pas phosphorylées, nous pourrions en déduire que l'oxydation des acides gras est inhibée et ne serait pas un effet majeur du prétraitement par le EP 80317. À l'opposé, la phosphorylation d'ACC pourrait suggérer une oxydation accrue des acides gras au niveau hépatique chez les souris prétraitées par le EP 80317. Outre la détermination de l'activité de l'ACC, la détermination des répercussions du prétraitement sur le métabolisme des lipides au niveau hépatique nécessiterait la détermination de l'activité de l'AMPK, qui régule négativement celle de l'ACC (Carlson et Winder, 1999). De plus, il serait intéressant de déterminer les changements d'expression des gènes impliqués dans la voie de la synthèse *de novo* des acides gras, incluant les facteurs de transcriptions *Srebp1c*, *Chrebp* (*carbohydrate responsive element-binding protein*, responsable de la synthèse *de novo* à partir du glucose et de ses dérivés) et le récepteur nucléaire *Pparg*, de même que *Fasn* qui encode l'enzyme FAS (Strable et Ntambi, 2010). Ces marqueurs pourraient nous informer des effets du EP 80317 sur le métabolisme lipidique au niveau hépatique.

4.5. Conclusion

Pour conclure, un prétraitement par le EP 80317, un ligand sélectif du CD36, réduit la taille de l'infarctus dans le contexte d'I/R du myocarde. Les effets

cardioprotecteurs du EP 80317 sont associés à une réduction des taux plasmatiques d'AGNE réduit pendant la reperfusion. Nos résultats ont montré que cette action pourrait être expliquée en partie par une réduction de la lipolyse et d'une augmentation transitoire du stockage des acides gras au niveau du tissu adipeux, ce qui causerait par conséquent une diminution du captage et de la β -oxydation des AGNE au profit du glucose. Ces changements métaboliques bénéfiques sont associés à une amélioration de l'hémodynamie cardiaque (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe).

4.6. Perspectives

Nos études ont montré une réduction de la taille de l'infarctus par un prétraitement de 2 semaines avec le EP 80317. Ce traitement préventif plutôt que curatif du EP 80317 n'est pas très pratique en clinique. Cependant, le EP 80317 a été employé pour réduire l'athérosclérose dans des études publiées par notre laboratoire (Marleau *et al.*, 2005), une pathologie potentiellement à l'origine d'une I/R du myocarde (Gawaz, 2004). Ainsi, l'utilisation du EP 80317 dans un contexte préventif pourrait donc être observée chez des patients souffrants d'athérosclérose. La prochaine étape serait d'administrer le EP 80317 en une seule dose pendant ou après l'ischémie afin d'étudier les effets du EP 80317 dans un contexte d'un traitement aigu (curatif).

Nous avons mesuré le profil des gènes marqueurs des adipocytes bruns au niveau du tissu adipeux blanc, mais nous n'avons pas mesuré l'expression de ces gènes au niveau du tissu adipeux brun. Il serait possible que l'activité thermogénique du tissu adipeux brun soit augmentée (Ricquier et Bouillaud, 2000), ce qui contribuerait aussi à la diminution des AGNE en circulation. Pour tester cette hypothèse, il faudrait isoler le tissu adipeux brun retrouvé au niveau du médiastin ou dans la région interscapulaire (Tran et Kahn, 2010) et mesurer la proportion de tissu adipeux brun versus tissu adipeux blanc chez le groupe traité au EP 80317 par comparaison au groupe témoin.

Bien que nous ayons mesuré les paramètres hémodynamiques, la fonction et le métabolisme du ventricule gauche à 6 et 48 heures de reperfusion après l'ischémie du myocarde (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe), nous n'avons pas investigué s'il y avait occurrence d'un remodelage ventriculaire à plus long terme et l'effet du traitement sur ce dernier. Le remodelage ventriculaire est un changement structural du myocarde suite à un dommage des ventricules, tel que l'infarctus du myocarde, qui peut durer des semaines, voire plusieurs mois (Gaasch et Zile, 2011). Les complications principales sont associées à une hypertrophie des cardiomyocytes, une diminution de la fonction ventriculaire et la présence de fibrose (Ambardekar et Buttrick, 2011). Le groupe de Yang *et al.* (2002) a observé les changements du remodelage ventriculaire à différents temps après l'infarctus du myocarde et a montré

qu'il y avait une accumulation significative de collagène au 7^e jour après l'infiltration des neutrophiles, macrophages et lymphocytes. Le groupe de Tivesten *et al.* (2000) a montré qu'il y avait une amélioration de la fonction systolique, du débit cardiaque et une réduction de la résistance vasculaire après un traitement de 14 jours avec l'hexaréline débutant 4 semaines après l'I/R du myocarde, tandis que dans notre modèle, les effets bénéfiques du traitement étaient déjà apparents après 6 heures de reperfusion (Bessi *et al.*, 2012, article en annexe). On pourrait donc mesurer la quantité de collagène et la morphologie des cardiomyocytes par des coupes histologiques et s'attendre à ce que l'amélioration de la fonction ventriculaire soit maintenue après 7 jours de reperfusion.

Références

- Abel E.D. (2004). Glucose transport in the heart. *Front Biosci.* **9** : 201-215.
- Ahmadian M., Duncan R.E., Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., and Sul H.S. (2007). Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol.* **2** : 229-237.
- Akkaoui M., Cohen I., Esnous C., Lenoir V., Sournac M., Girard J., and Prip-Buus C. (2009). Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J.* **420** : 429-438.
- Allred C.C., Krennmayr T., Koutsari C., Zhou L., Ali A.H., and Jensen M.D. (2011). A novel ELISA for measuring CD36 protein in human adipose tissue. *J Lipid Res.* **52** : 408-415.
- Altintas M.M., Azad A., Nayer B., Contreras G., Zaias J., Faul C., Reiser J., and Nayer A. (2011). Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *J Lipid Res.* **52** : 480-488.
- Ambardekar A.V. and Buttrick P.M. (2011). Reverse remodeling with left ventricular assist devices: a review of clinical, cellular, and molecular effects. *Circ Heart Fail.* **4** : 224-233.
- Arch J.R. and Wilson S. (1996). Prospects for beta 3-adrenoceptor agonists in the treatment of obesity and diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **20** : 191-199.
- Avallone R., Demers A., Rodrigue-Way A., Bujold K., Harb D., Anghel S., Wahli W., Marleau S., Ong H., and Tremblay A. (2006). A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Mol Endocrinol.* **20** : 3165-3178.

Azaouagh A., Churzidse S., Konorza T., and Erbel R. (2011). Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a review and update. *Clin Res Cardiol.* **100** : 383-394.

Baillie A.G., Coburn C.T., and Abumrad N.A. (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol.* **153** : 75-81.

Ballard F.J., Hanson R.W., and Leveille G.A. (1967). Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J Biol Chem.* **242** : 2746-2750.

Baron A.D., Brechtel G., Wallace P., and Edelman S.V. (1988). Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol.* **255** : E769-E774.

Barron J.T., Gu L., and Parrillo J.E. (2000). NADH/NAD redox state of cytoplasmic glycolytic compartments in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **279** : H2872-H2878.

Baruch D.I., Ma X.C., Pasloske B., Howard R.J., and Miller L.H. (1999). CD36 peptides that block cytoadherence define the CD36 binding region for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Blood.* **94** : 2121-2127.

Bederman I.R., Foy S., Chandramouli V., Alexander J.C., and Previs S.F. (2009). Triglyceride synthesis in epididymal adipose tissue: contribution of glucose and non-glucose carbon sources. *J Biol Chem.* **284** : 6101-6108.

Bedoucha M., Atzpodien E., and Boelsterli U.A. (2001). Diabetic KKAY mice exhibit increased hepatic PPAR γ 1 gene expression and develop hepatic steatosis upon chronic treatment with antidiabetic thiazolidinediones. *J Hepatol.* **35** : 17-23.

Belardinelli L., Shryock J.C., and Fraser H. (2006). Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. *Heart.* **92 Suppl 4** : iv6-iv14.

Benhabbouche S., Crola da S.C., Abrial M., and Ferrera R. (2011). [The basis of ischemia-reperfusion and myocardial protection]. *Ann Fr Anesth Reanim.* **30 Suppl 1** : S2-16.

Berger M., Hagg S.A., Goodman M.N., and Ruderman N.B. (1976). Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Effects of starvation, diabetes, fatty acids, acetoacetate, insulin and exercise on glucose uptake and disposition. *Biochem J.* **158** : 191-202.

Bessi V.L., Labbe S.M., Huynh D.N., Menard L., Jossart C., Febbraio M., Guerin B., Bentourkia M., Lecomte R., Carpentier A.C., Ong H., and Marleau S. (2012). EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice. *Cardiovasc Res.*

Bezaire V., Bruce C.R., Heigenhauser G.J., Tandon N.N., Glatz J.F., Luiken J.J., Bonen A., and Spriet L.L. (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **290** : E509-E515.

Bodart V., Febbraio M., Demers A., McNicoll N., Pohankova P., Perreault A., Sejlitz T., Escher E., Silverstein R.L., Lamontagne D., and Ong H. (2002). CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res.* **90** : 844-849.

Boelsterli U.A. and Bedoucha M. (2002). Toxicological consequences of altered peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression in the liver: insights from models of obesity and type 2 diabetes. *Biochem Pharmacol.* **63** : 1-10.

Bonetti P.O., Lerman L.O., and Lerman A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **23** : 168-175.

Bowker-Kinley M.M., Davis W.I., Wu P., Harris R.A., and Popov K.M. (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J.* **329 (Pt 1)** : 191-196.

Brasaemle D.L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* **48** : 2547-2559.

Brasaemle D.L., Rubin B., Harten I.A., Gruia-Gray J., Kimmel A.R., and Londos C. (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem.* **275** : 38486-38493.

Braunwald E. and Kloner R.A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest.* **76** : 1713-1719.

Browning J.D. and Horton J.D. (2004). Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* **114** : 147-152.

Buerke M., Pruefer D., Sankat D., Carter J.M., Buerke U., Russ M., Schlitt A., Friedrich I., Borgermann J., Vahl C.F., and Werdan K. (2007). Effects of aprotinin on gene expression and protein synthesis after ischemia and reperfusion in rats. *Circulation.* **116** : I121-I126.

Bujold K., Rhains D., Jossart C., Febbraio M., Marleau S., and Ong H. (2009). CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc Res.* **83** : 457-464.

Cadoudal T., Fouque F., Benelli C., and Forest C. (2008). [Glyceroneogenesis and PEPCK-C: pharmacological targets in type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris).* **24** : 407-413.

Cadoudal T., Leroyer S., Reis A.F., Tordjman J., Durant S., Fouque F., Collinet M., Quette J., Chauvet G., Beale E., Velho G., Antoine B., Benelli C., and Forest C. (2005). Proposed involvement of adipocyte glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the metabolic syndrome. *Biochimie.* **87** : 27-32.

Cannon B. and Nedergaard J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* **84** : 277-359.

Carlson C.L. and Winder W.W. (1999). Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. *J Appl Physiol.* **86** : 669-674.

Chabowski A., Chatham J.C., Tandon N.N., Calles-Escandon J., Glatz J.F., Luiken J.J., and Bonen A. (2006). Fatty acid transport and FAT/CD36 are increased in red but not in white skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **291** : E675-E682.

Chong M.F., Hodson L., Bickerton A.S., Roberts R., Neville M., Karpe F., Frayn K.N., and Fielding B.A. (2008). Parallel activation of de novo lipogenesis and stearoyl-CoA desaturase activity after 3 d of high-carbohydrate feeding. *Am J Clin Nutr.* **87** : 817-823.

Coburn C.T., Hajri T., Ibrahimi A., and Abumrad N.A. (2001). Role of CD36 in membrane transport and utilization of long-chain fatty acids by different tissues. *J Mol Neurosci.* **16** : 117-121.

Coburn C.T., Knapp F.F., Jr., Febbraio M., Beets A.L., Silverstein R.L., and Abumrad N.A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem.* **275** : 32523-32529.

Cohen A.W., Razani B., Schubert W., Williams T.M., Wang X.B., Iyengar P., Brasaemle D.L., Scherer P.E., and Lisanti M.P. (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes.* **53** : 1261-1270.

Collins-Nakai R.L., Noseworthy D., and Lopaschuk G.D. (1994). Epinephrine increases ATP production in hearts by preferentially increasing glucose metabolism. *Am J Physiol.* **267** : H1862-H1871.

Davani E.Y., Brumme Z., Singhera G.K., Cote H.C., Harrigan P.R., and Dorscheid D.R. (2003). Insulin-like growth factor-1 protects ischemic murine myocardium from ischemia/reperfusion associated injury. *Crit Care.* **7** : R176-R183.

Demers A., McNicoll N., Febbraio M., Servant M., Marleau S., Silverstein R., and Ong H. (2004). Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J.* **382** : 417-424.

Depre C., Rider M.H., and Hue L. (1998). Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem.* **258** : 277-290.

Dewald O., Zymek P., Winkelmann K., Koerting A., Ren G., Abou-Khamis T., Michael L.H., Rollins B.J., Entman M.L., and Frangogiannis N.G. (2005). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res.* **96** : 881-889.

Di Chiara A., Dall'Armellina E., Badano L.P., Meduri S., Pezzutto N., and Fioretti P.M. (2010). Predictive value of cardiac troponin-I compared to creatine kinase-myocardial band for the assessment of infarct size as measured by cardiac magnetic resonance. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. **11** : 587-592.

Djouadi F., Brandt J.M., Weinheimer C.J., Leone T.C., Gonzalez F.J., and Kelly D.P. (1999). The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the control of cardiac lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **60** : 339-343.

Djouadi F., Weinheimer C.J., Saffitz J.E., Pitchford C., Bastin J., Gonzalez F.J., and Kelly D.P. (1998). A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha- deficient mice. *J Clin Invest.* **102** : 1083-1091.

Dulloo A.G., Gubler M., Montani J.P., Seydoux J., and Solinas G. (2004). Substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation: a thermogenic mechanism against skeletal muscle lipotoxicity and glucolipotoxicity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **28 Suppl 4** : S29-S37.

Duncan R.E., Ahmadian M., Jaworski K., Sarkadi-Nagy E., and Sul H.S. (2007). Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr.* **27** : 79-101.

Dworakowski R., Anilkumar N., Zhang M., and Shah A.M. (2006). Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans.* **34** : 960-964.

Egan J.J., Greenberg A.S., Chang M.K., Wek S.A., Moos M.C., Jr., and Londos C. (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89** : 8537-8541.

Fain J.N. and Garcija-Sainz J.A. (1983). Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J Lipid Res.* **24** : 945-966.

Febbraio M., Abumrad N.A., Hajjar D.P., Sharma K., Cheng W., Pearce S.F., and Silverstein R.L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem.* **274** : 19055-19062.

Febbraio M., Hajjar D.P., and Silverstein R.L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* **108** : 785-791.

Febbraio M., Podrez E.A., Smith J.D., Hajjar D.P., Hazen S.L., Hoff H.F., Sharma K., and Silverstein R.L. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest.* **105** : 1049-1056.

Fei W., Du X., and Yang H. (2011). Seipin, adipogenesis and lipid droplets. *Trends Endocrinol Metab.* **22** : 204-210.

Ferdinandy P., Schulz R., and Baxter G.F. (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev.* **59** : 418-458.

Forest C., Franckhauser S., Glorian M., Antras-Ferry J., Robin D., and Robin P. (1997). Regulation of gene transcription by fatty acids, fibrates and prostaglandins: the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene as a model. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **57** : 47-56.

Forest C., Tordjman J., Glorian M., Duplus E., Chauvet G., Quette J., Beale E.G., and Antoine B. (2003). Fatty acid recycling in adipocytes: a role for glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem Soc Trans.* **31** : 1125-1129.

Frayn K.N., Karpe F., Fielding B.A., Macdonald I.A., and Coppack S.W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **27** : 875-888.

Fredrikson G., Tornqvist H., and Belfrage P. (1986). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta*. **876** : 288-293.

Frieda S., Pearce A., Wu J., and Silverstein R.L. (1995). Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36. *J Biol Chem*. **270** : 2981-2986.

Gaasch W.H. and Zile M.R. (2011). Left ventricular structural remodeling in health and disease: with special emphasis on volume, mass, and geometry. *J Am Coll Cardiol*. **58** : 1733-1740.

Gao J.G. and Simon M. (2006). Molecular screening for GS2 lipase regulators: inhibition of keratinocyte retinylester hydrolysis by TIP47. *J Invest Dermatol*. **126** : 2087-2095.

Garton A.J., Campbell D.G., Carling D., Hardie D.G., Colbran R.J., and Yeaman S.J. (1989). Phosphorylation of bovine hormone-sensitive lipase by the AMP-activated protein kinase. A possible antilipolytic mechanism. *Eur J Biochem*. **179** : 249-254.

Gautheron D.C. (1984). Mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory chain: review. *J Inherit Metab Dis*. **7 Suppl 1** : 57-61.

Gawaz M. (2004). Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res*. **61** : 498-511.

Gaziano T.A. (2007). Reducing the growing burden of cardiovascular disease in the developing world. *Health Aff (Millwood)*. **26** : 13-24.

Ghorbani M. and Himms-Hagen J. (1997). Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **21** : 465-475.

Gibbons G.F., Islam K., and Pease R.J. (2000). Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta*. **1483** : 37-57.

Giorgino F., Laviola L., and Eriksson J.W. (2005). Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand.* **183** : 13-30.

Greenberg A.S., Egan J.J., Wek S.A., Garty N.B., Blanchette-Mackie E.J., and Londos C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem.* **266** : 11341-11346.

Greenberg A.S., Egan J.J., Wek S.A., Moos M.C., Jr., Londos C., and Kimmel A.R. (1993). Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90** : 12035-12039.

Griffin E., Re A., Hamel N., Fu C., Bush H., McCaffrey T., and Asch A.S. (2001). A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med.* **7** : 840-846.

Haemmerle G., Zimmermann R., Hayn M., Theussl C., Waeg G., Wagner E., Sattler W., Magin T.M., Wagner E.F., and Zechner R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem.* **277** : 4806-4815.

Hajri T. and Abumrad N.A. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nutr.* **22** : 383-415.

Harris C.A., Haas J.T., Streeper R.S., Stone S.J., Kumari M., Yang K., Han X., Brownell N., Gross R.W., Zechner R., and Farese R.V., Jr. (2011). DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res.* **52** : 657-667.

Hauton D., Bennett M.J., and Evans R.D. (2001). Utilisation of triacylglycerol and non-esterified fatty acid by the working rat heart: myocardial lipid substrate preference. *Biochim Biophys Acta.* **1533** : 99-109.

Hershberger R.E., Morales A., and Siegfried J.D. (2010). Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals. *Genet Med.* **12** : 655-667.

Holness M.J. and Sugden M.C. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* **31** : 1143-1151.

Hoosdally S.J., Andress E.J., Wooding C., Martin C.A., and Linton K.J. (2009). The Human Scavenger Receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function. *J Biol Chem.* **284** : 16277-16288.

Hsieh H.B., Lersch R.A., Callahan D.E., Hayward S., Wong M., Clark O.H., and Weier H.U. (2001). Monitoring signal transduction in cancer: cDNA microarray for semiquantitative analysis. *J Histochem Cytochem.* **49** : 1057-1058.

Hue L. and Taegtmeier H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **297** : E578-E591.

Hunt J.N. and Stubbs D.F. (1975). The volume and energy content of meals as determinants of gastric emptying. *J Physiol.* **245** : 209-225.

Janabi M., Yamashita S., Hirano K., Sakai N., Hiraoka H., Matsumoto K., Zhang Z., Nozaki S., and Matsuzawa Y. (2000). Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20** : 1953-1960.

Jaswal J.S., Keung W., Wang W., Ussher J.R., and Lopaschuk G.D. (2011). Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta.* **1813** : 1333-1350.

Jeong H.W., Lee J.W., Kim W.S., Choe S.S., Kim K.H., Park H.S., Shin H.J., Lee G.Y., Shin D., Lee H., Lee J.H., Choi E.B., Lee H.K., Chung H., Park S.B., Park K.S., Kim H.S., Ro S., and Kim J.B. (2011). A newly identified CG301269 improves lipid and glucose metabolism without body weight gain through activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma. *Diabetes.* **60** : 496-506.

Jordan J.E., Zhao Z.Q., and Vinten-Johansen J. (1999). The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* **43** : 860-878.

Juge-Aubry C.E., Henrichot E., and Meier C.A. (2005). Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **19** : 547-566.

Jurado L.A., Song S., Roesler W.J., and Park E.A. (2002). Conserved amino acids within CCAAT enhancer-binding proteins (C/EBP(alpha) and beta) regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression. *J Biol Chem.* **277** : 27606-27612.

Kadenbach B., Ramzan R., Wen L., and Vogt S. (2010). New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim Biophys Acta.* **1800** : 205-212.

Katz A.M. and Messineo F.C. (1982). Fatty acid effects on membranes: possible role in the pathogenesis of ischemic myocardial damage. *J Mol Cell Cardiol.* **14 Suppl 3** : 119-122.

Kelley D.E., Goodpaster B., Wing R.R., and Simoneau J.A. (1999). Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol.* **277** : E1130-E1141.

Kennedy D.J., Kuchibhotla S., Westfall K.M., Silverstein R.L., Morton R.E., and Febbraio M. (2011). A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovasc Res.* **89** : 604-613.

Kim C., Xuong N.H., and Taylor S.S. (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science.* **307** : 690-696.

Kim K.H., Lopez-Casillas F., Bai D.H., Luo X., and Pape M.E. (1989). Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. *FASEB J.* **3** : 2250-2256.

Koonen D.P., Glatz J.F., Bonen A., and Luiken J.J. (2005). Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* **1736** : 163-180.

Koonen D.P., Jacobs R.L., Febbraio M., Young M.E., Soltys C.L., Ong H., Vance D.E., and Dyck J.R. (2007). Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes.* **56** : 2863-2871.

Kuang M., Febbraio M., Wagg C., Lopaschuk G.D., and Dyck J.R. (2004). Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation*. **109** : 1550-1557.

Kudo N., Barr A.J., Barr R.L., Desai S., and Lopaschuk G.D. (1995). High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*. **270** : 17513-17520.

Large V., Peroni O., Letexier D., Ray H., and Beylot M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab*. **30** : 294-309.

Lehman J.J., Barger P.M., Kovacs A., Saffitz J.E., Medeiros D.M., and Kelly D.P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*. **106** : 847-856.

Levin M.C., Monetti M., Watt M.J., Sajan M.P., Stevens R.D., Bain J.R., Newgard C.B., Farese R.V., Sr., and Farese R.V., Jr. (2007). Increased lipid accumulation and insulin resistance in transgenic mice expressing DGAT2 in glycolytic (type II) muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **293** : E1772-E1781.

Libby P. (2009). Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Lipid Res*. **50 Suppl** : S352-S357.

Lin H. and Suleiman M.S. (2003). Cariporide enhances lactate clearance upon reperfusion but does not alter lactate accumulation during global ischaemia. *Pflugers Arch*. **447** : 8-13.

Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D., Jaswal J.S., and Stanley W.C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. **90** : 207-258.

Lowell B.B. and Shulman G.I. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. **307** : 384-387.

Luiken J.J., Coort S.L., Willems J., Coumans W.A., Bonen A., van der Vusse G.J., and Glatz J.F. (2003). Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*. **52** : 1627-1634.

Luiken J.J., Dyck D.J., Han X.X., Tandon N.N., Arumugam Y., Glatz J.F., and Bonen A. (2002). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **282** : E491-E495.

MacLennan N.K., Rahib L., Shin C., Fang Z., Horvath S., Dean J., Liao J.C., McCabe E.R., and Dipple K.M. (2006). Targeted disruption of glycerol kinase gene in mice: expression analysis in liver shows alterations in network partners related to glycerol kinase activity. *Hum Mol Genet.* **15** : 405-415.

Marcinkiewicz A., Gauthier D., Garcia A., and Brasaemle D.L. (2006). The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem.* **281** : 11901-11909.

Marian A.J. (2010). Hypertrophic cardiomyopathy: from genetics to treatment. *Eur J Clin Invest.* **40** : 360-369.

Marleau S., Harb D., Bujold K., Avallone R., Iken K., Wang Y., Demers A., Sirois M.G., Febbraio M., Silverstein R.L., Tremblay A., and Ong H. (2005). EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J.* **19** : 1869-1871.

Martin S., Okano S., Kistler C., Fernandez-Rojo M.A., Hill M.M., and Parton R.G. (2009). Spatiotemporal regulation of early lipolytic signaling in adipocytes. *J Biol Chem.* **284** : 32097-32107.

Matthias A., Ohlson K.B., Fredriksson J.M., Jacobsson A., Nedergaard J., and Cannon B. (2000). Thermogenic responses in brown fat cells are fully UCP1-dependent. UCP2 or UCP3 do not substitute for UCP1 in adrenergically or fatty acid-induced thermogenesis. *J Biol Chem.* **275** : 25073-25081.

McGarry J.D. and Brown N.F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* **244** : 1-14.

Miquilena-Colina M.E., Lima-Cabello E., Sanchez-Campos S., Garcia-Mediavilla M.V., Fernandez-Bermejo M., Lozano-Rodriguez T., Vargas-Castrillon J., Buque X., Ochoa B., Aspichueta P., Gonzalez-Gallego J., and Garcia-Monzon C. (2011). Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin

resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*. **60** : 1394-1402.

Mor I., Cheung E.C., and Vousden K.H. (2011). Control of Glycolysis through Regulation of PFK1: Old Friends and Recent Additions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.

Motojima K., Passilly P., Peters J.M., Gonzalez F.J., and Latruffe N. (1998). Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*. **273** : 16710-16714.

Mueller H.S. and Ayres S.M. (1978). Metabolic response of the heart in acute myocardial infarction in man. *Am J Cardiol*. **42** : 363-371.

Murphy M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. **417** : 1-13.

Murthy M.S. and Pande S.V. (1987). Some differences in the properties of carnitine palmitoyltransferase activities of the mitochondrial outer and inner membranes. *Biochem J*. **248** : 727-733.

Nagaya N., Uematsu M., Kojima M., Ikeda Y., Yoshihara F., Shimizu W., Hosoda H., Hirota Y., Ishida H., Mori H., and Kangawa K. (2001). Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation*. **104** : 1430-1435.

Naghavi M., Libby P., Falk E., Casscells S.W., Litovsky S., Rumberger J., Badimon J.J., Stefanadis C., Moreno P., Pasterkamp G., Fayad Z., Stone P.H., Waxman S., Raggi P., Madjid M., Zarrabi A., Burke A., Yuan C., Fitzgerald P.J., Siscovick D.S., de Korte C.L., Aikawa M., Juhani Airaksinen K.E., Assmann G., Becker C.R., Chesebro J.H., Farb A., Galis Z.S., Jackson C., Jang I.K., Koenig W., Lodder R.A., March K., Demirovic J., Navab M., Priori S.G., Rekhter M.D., Bahr R., Grundy S.M., Mehran R., Colombo A., Boerwinkle E., Ballantyne C., Insull W., Jr., Schwartz R.S., Vogel R., Serruys P.W., Hansson G.K., Faxon D.P., Kaul S., Drexler H., Greenland P., Muller J.E., Virmani R., Ridker P.M., Zipes D.P., Shah P.K., and Willerson J.T. (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*. **108** : 1664-1672.

Nakashima Y., Wight T.N., and Sueishi K. (2008). Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res.* **79** : 14-23.

Nassir F., Wilson B., Han X., Gross R.W., and Abumrad N.A. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem.* **282** : 19493-19501.

Navazo M.D., Daviet L., Savill J., Ren Y., Leung L.L., and McGregor J.L. (1996). Identification of a domain (155-183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Biol Chem.* **271** : 15381-15385.

Nedergaard J., Golozoubova V., Matthias A., Asadi A., Jacobsson A., and Cannon B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta.* **1504** : 82-106.

Nedergaard J., Petrovic N., Lindgren E.M., Jacobsson A., and Cannon B. (2005). PPARgamma in the control of brown adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* **1740** : 293-304.

Nihoyannopoulos P. and Dawson D. (2009). Restrictive cardiomyopathies. *Eur J Echocardiogr.* **10** : iii23-iii33.

Nishino N., Tamori Y., and Kasuga M. (2007). Insulin efficiently stores triglycerides in adipocytes by inhibiting lipolysis and repressing PGC-1alpha induction. *Kobe J Med Sci.* **53** : 99-106.

Nisoli E., Carruba M.O., Tonello C., Macor C., Federspil G., and Vettor R. (2000). Induction of fatty acid translocase/CD36, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2, leptin, uncoupling proteins 2 and 3, and tumor necrosis factor-alpha gene expression in human subcutaneous fat by lipid infusion. *Diabetes.* **49** : 319-324.

Nisoli E., Tonello C., Briscini L., and Carruba M.O. (1997). Inducible nitric oxide synthase in rat brown adipocytes: implications for blood flow to brown adipose tissue. *Endocrinology.* **138** : 676-682.

Nye C., Kim J., Kalhan S.C., and Hanson R.W. (2008). Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab.* **19** : 356-361.

Olswang Y., Blum B., Cassuto H., Cohen H., Biberman Y., Hanson R.W., and Reshef L. (2003). Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation. *J Biol Chem.* **278** : 12929-12936.

Opie L.H. (1975). Metabolism of free fatty acids, glucose and catecholamines in acute myocardial infarction. Relation to myocardial ischemia and infarct size. *Am J Cardiol.* **36** : 938-953.

Orchard C.H., Houser S.R., Kort A.A., Bahinski A., Capogrossi M.C., and Lakatta E.G. (1987). Acidosis facilitates spontaneous sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in rat myocardium. *J Gen Physiol.* **90** : 145-165.

Park H., Kaushik V.K., Constant S., Prentki M., Przybytkowski E., Ruderman N.B., and Saha A.K. (2002). Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem.* **277** : 32571-32577.

Pentikainen M.O., Oorni K., Ala-Korpela M., and Kovanen P.T. (2000). Modified LDL - trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med.* **247** : 359-370.

Perrotta I. (2011). Ultrastructural Features of Human Atherosclerosis. *Ultrastruct Pathol.*

Polekhina G., Gupta A., Michell B.J., van D.B., Murthy S., Feil S.C., Jennings I.G., Campbell D.J., Witters L.A., Parker M.W., Kemp B.E., and Stapleton D. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol.* **13** : 867-871.

Puente Navazo M.D., Daviet L., Ninio E., and McGregor J.L. (1996). Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **16** : 1033-1039.

Reshef L., Olswang Y., Cassuto H., Blum B., Croniger C.M., Kalhan S.C., Tilghman S.M., and Hanson R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem.* **278** : 30413-30416.

Ribichini F. and Wijns W. (2002). Acute myocardial infarction: reperfusion treatment. *Heart*. **88** : 298-305.

Ricquier D. and Bouillaud F. (2000). Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol*. **529 Pt 1** : 3-10.

Robergs R.A., Ghiasvand F., and Parker D. (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **287** : R502-R516.

Roden M. (2006). Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes--pathogenesis and clinical relevance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. **2** : 335-348.

Rodrigue-Way A., Demers A., Ong H., and Tremblay A. (2007). A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology*. **148** : 1009-1018.

Roger V.L., Go A.S., Lloyd-Jones D.M., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Makuc D.M., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., Moy C.S., Mozaffarian D., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Soliman E.Z., Sorlie P.D., Sotoodehnia N., Turan T.N., Virani S.S., Wong N.D., Woo D., and Turner M.B. (2012). Heart Disease and Stroke Statistics--2012 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. **125** : e2-e220.

Ross R., Leger L., Morris D., de G.J., and Guardo R. (1992). Quantification of adipose tissue by MRI: relationship with anthropometric variables. *J Appl Physiol*. **72** : 787-795.

Saely C.H., Geiger K., and Drexel H. (2012). Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*. **58** : 15-23.

Saggerson D. (2008). Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr*. **28** : 253-272.

Samuel J.L., Schaub M.C., Zaugg M., Mamas M., Dunn W.B., and Swynghedauw B. (2008). Genomics in cardiac metabolism. *Cardiovasc Res*. **79** : 218-227.

Schaffer J.E. (2003). Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol.* **14** : 281-287.

Schlossman D.M. and Bell R.M. (1976). Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. Evidence that the sn-glycerol-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase activities are dual catalytic functions of a single microsomal enzyme. *J Biol Chem.* **251** : 5738-5744.

Schwenk R.W., Luiken J.J., Bonen A., and Glatz J.F. (2008). Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res.* **79** : 249-258.

Seale P., Kajimura S., and Spiegelman B.M. (2009). Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. *Genes Dev.* **23** : 788-797.

Shi Y. and Cheng D. (2009). Beyond triglyceride synthesis: the dynamic functional roles of MGAT and DGAT enzymes in energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **297** : E10-E18.

Shimomura I., Shimano H., Horton J.D., Goldstein J.L., and Brown M.S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest.* **99** : 838-845.

Silverstein R.L. and Febbraio M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* **2** : re3-

Silverstein R.L., Li W., Park Y.M., and Rahaman S.O. (2010). Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **121** : 206-220.

Smith B.K., Jain S.S., Rimbaud S., Dam A., Quadrilatero J., Ventura-Clapier R., Bonen A., and Holloway G.P. (2011). FAT/CD36 is located on the outer mitochondrial membrane, upstream of long-chain acyl-CoA synthetase, and regulates palmitate oxidation. *Biochem J.* **437** : 125-134.

Solaro R.J. and Rarick H.M. (1998). Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res.* **83** : 471-480.

Stahl A., Gimeno R.E., Tartaglia L.A., and Lodish H.F. (2001). Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab.* **12** : 266-273.

Stanley W.C., Lopaschuk G.D., Hall J.L., and McCormack J.G. (1997). Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res.* **33** : 243-257.

Strable M.S. and Ntambi J.M. (2010). Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **45** : 199-214.

Su X. and Abumrad N.A. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab.* **20** : 72-77.

Sugden M.C. and Holness M.J. (2003). Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **284** : E855-E862.

Taha M. and Lopaschuk G.D. (2007). Alterations in energy metabolism in cardiomyopathies. *Ann Med.* **39** : 594-607.

Tanasijevic M.J., Cannon C.P., and Antman E.M. (1999). The role of cardiac troponin-I (cTnI) in risk stratification of patients with unstable coronary artery disease. *Clin Cardiol.* **22** : 13-16.

Tani M. and Neely J.R. (1989). Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circ Res.* **65** : 1045-1056.

Tansey J.T., Sztalryd C., Gruia-Gray J., Roush D.L., Zee J.V., Gavrilova O., Reitman M.L., Deng C.X., Li C., Kimmel A.R., and Londos C. (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98** : 6494-6499.

Tarnavski O., McMullen J.R., Schinke M., Nie Q., Kong S., and Izumo S. (2004). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse

models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics*. **16** : 349-360.

Thampy K.G. (1989). Formation of malonyl coenzyme A in rat heart. Identification and purification of an isozyme of A carboxylase from rat heart. *J Biol Chem*. **264** : 17631-17634.

Tivesten A., Bollano E., Caidahl K., Kujacic V., Sun X.Y., Hedner T., Hjalmarson A., Bengtsson B.A., and Isgaard J. (2000). The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology*. **141** : 60-66.

Tran T.T. and Kahn C.R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol*. **6** : 195-213.

Triantafilou M., Gamper F.G., Haston R.M., Mouratis M.A., Morath S., Hartung T., and Triantafilou K. (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem*. **281** : 31002-31011.

Van Der Lee K.A., Vork M.M., De Vries J.E., Willemsen P.H., Glatz J.F., Reneman R.S., van der Vusse G.J., and Van B.M. (2000). Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J Lipid Res*. **41** : 41-47.

van Hall G., Sacchetti M., Radegran G., and Saltin B. (2002). Human skeletal muscle fatty acid and glycerol metabolism during rest, exercise and recovery. *J Physiol*. **543** : 1047-1058.

Vega R.B., Huss J.M., and Kelly D.P. (2000). The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol*. **20** : 1868-1876.

Venturini A., Ascione R., Lin H., Polesel E., Angelini G.D., and Suleiman M.S. (2009). The importance of myocardial amino acids during ischemia and reperfusion in dilated left ventricle of patients with degenerative mitral valve disease. *Mol Cell Biochem*. **330** : 63-70.

Villena J.A., Roy S., Sarkadi-Nagy E., Kim K.H., and Sul H.S. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem.* **279** : 47066-47075.

Virtanen K.A., Lidell M.E., Orava J., Heglind M., Westergren R., Niemi T., Taittonen M., Laine J., Savisto N.J., Enerback S., and Nuutila P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* **360** : 1518-1525.

Wakil S.J. and Abu-Elheiga L.A. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* **50 Suppl** : S138-S143.

Watt M.J. (2009). Storing up trouble: does accumulation of intramyocellular triglyceride protect skeletal muscle from insulin resistance? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **36** : 5-11.

Williamson J.R. and Cooper R.H. (1980). Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett.* **117 Suppl** : K73-K85.

Winder W.W. and Hardie D.G. (1999). AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol.* **277** : E1-10.

Wozniak S.E., Gee L.L., Wachtel M.S., and Frezza E.E. (2009). Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci.* **54** : 1847-1856.

Yamamoto Y., Gesta S., Lee K.Y., Tran T.T., Saadatirad P., and Kahn C.R. (2010). Adipose depots possess unique developmental gene signatures. *Obesity (Silver Spring).* **18** : 872-878.

Yang F., Liu Y.H., Yang X.P., Xu J., Kapke A., and Carretero O.A. (2002). Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol.* **87** : 547-555.

Yoshida H. and Kisugi R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta.* **411** : 1875-1882.

Fondation des maladies du coeur (2009). www.fmcoeur.com

Fondation des maladies du coeur (2011). www.fmcoeur.com

Annexe

EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice

Valérie L. Bessi^{1†}, Sébastien M. Labbé^{2†}, David N. Huynh¹, Liliane Ménard¹, Christian Jossart¹, Maria Febbraio³, Brigitte Guérin⁴, M'Hamed Bentourkia⁴, Roger Lecomte⁴, André C. Carpentier², Huy Ong^{1*}, and Sylvie Marleau^{1*}

¹Faculty of Pharmacy, Université de Montréal; ²Department of Medicine, Division of Endocrinology, Université de Sherbrooke; ³Department of Molecular Cardiology, Lerner Research Institute, Cleveland, OH, USA; ⁴Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

[†]Contributed equally.

*Corresponding authors: Sylvie Marleau and Huy Ong

Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville,

Montreal, Québec, Canada, H3C 3J7

Phone: 514-343-7110; Fax : 514-343-2102

Reprinted from Bessi et al. Cardiovasc. Res. 2012. [Epub ahead of print], by permission of Oxford University Press.

Abstract

Aims. The CD36 receptor plays an important role in facilitating fatty acid transport to the heart. The present study aimed to assess whether EP 80317, a selective synthetic peptide ligand of CD36, is cardioprotective in a murine model of myocardial ischaemia and reperfusion (MI/R) injury.

Methods and Results. Mice were pretreated with daily subcutaneous injections of EP 80317 for 14 days before being subjected to a 30-minute ligation of the left anterior descending coronary artery. The treatment reduced infarct area and improved myocardial haemodynamics and function, as shown by an increase of cardiac output, ejection fraction and stroke work, and a reduced total peripheral resistance. In contrast, administration of EP 51389, a tripeptide analogue devoid of binding affinity to CD36, did not protect against myocardial injury. Six hours after myocardial reperfusion, EP 80317-treated mice showed reduced myocardial fatty acid uptake, as assessed by micro-positron emission tomography, in agreement with reduced levels of circulating nonesterified fatty acids. Studies using [¹⁴C]-palmitate infusion revealed reduced lipolysis, although no significant change in insulin or catecholamine plasma levels were observed. Increased expression levels of adipogenic and anti-lipolytic genes further supported an effect of EP 80317 in preventing fatty acid mobilization from adipose tissue. No effect of the treatment was observed in CD36^{-/-} mice.

Conclusion. Our results show that pretreatment with EP 80317 protected the heart against damage and dysfunction elicited by MI/R, along with a transient reduction in peripheral lipolysis. Our findings support CD36 as a novel target for the treatment of ischaemic cardiopathy.

1. Introduction

CD36 has been shown to play a pivotal role in cellular fatty acid uptake, along with plasma membrane associated fatty acid binding and transport proteins.¹ CD36 function is closely related to its plasmalemmal localization, following its trafficking from an intracellular membrane compartment to lipid rafts, in a ubiquitin-regulated manner.² In agreement with its role in facilitating myocardial fatty acid uptake, CD36 overexpression was associated with intramyocardial lipid accumulation as well as energetically and functionally compromised hearts in aged mice,³ whereas CD36 deficiency was shown to rescue a lipotoxic form of cardiomyopathy through the preferential use of glucose as a source of energy.⁴ Together, these observations suggested that targeting CD36 may constitute a novel therapeutic avenue to reduce myocardial damage associated with ischaemia and reperfusion.

Early studies investigating the cardiovascular effect of hexarelin, a synthetic growth hormone-releasing peptide (GHRP) modeled from the structure of Met-enkephalin, revealed protectant activity against cardiac ischaemia that was independent of GH secretion.⁵⁻⁷ Along this line, CD36 was identified as a putative receptor for hexarelin binding to myocardial membranes.⁸ Yet, the dual binding of growth hormone secretagogue receptor-1a (GHS-R1a)-, and CD36-pathways by hexarelin prevented delineation of the role of CD36 in mediating the cardioprotective effect of the drug against myocardial ischaemia/reperfusion (MI/R).

The present study aimed to investigate the potentially cardioprotective effect of EP 80317, a GHRP analogue devoid of binding affinity towards GHS-R1a,⁹ on myocardial injury, oxidative metabolism and left ventricular (LV) function in a mouse model of MI/R. Micro-positron emission tomography (μ PET) imaging of [¹⁸F]-labelled fluoro-6-thia-heptadecanoic acid ([¹⁸F]-FTHA) and [¹⁸F]-labelled 2-fluorodeoxyglucose ([¹⁸F]-FDG) and real-time LV pressure-volume relations were

used for the investigation of cardiac metabolism and function in mice pretreated with EP 80317 or vehicle (0.9% NaCl) for 14 days prior to undergoing a transient occlusion of the left anterior descending (LAD) coronary artery. Our results show that EP 80317 exerts a cardioprotective effect following transient LV ischaemia in mice.

2. Methods

2.1 Animals

All animal experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (Comité de déontologie de l'Université de Montréal), in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (no: 85-23, revised 1996). CD36-deficient (CD36^{-/-}) mice and their control littermates (CD36^{+/+}) were generated as described previously.¹⁰ Mice were sorted into three main study protocols: 1) determination of myocardial infarct size after 48 h reperfusion; 2) myocardial metabolic studies during the early reperfusion stage (6 h); and 3) myocardial functional recovery at 6 and 48 h of reperfusion.

2.2. Ischaemia-reperfusion of the left descending coronary artery bed

Myocardial I/R was performed according to Tarnavski *et al.*¹¹ as detailed in supplementary material online, Methods. Briefly, 3-4-month old male mice were injected subcutaneously (s.c.) with EP 80317 (289 nmol/kg) or vehicle (0.9% NaCl) daily during 14 days and treated 30 min before being subjected to acute (30 min) coronary artery occlusion and on the following day. Prior to surgery, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with buprenorphine (0.05 mg/kg), intubated and artificially ventilated. Anaesthesia was maintained with 2% isoflurane and the temperature of the animals was maintained using a heating pad. The adequacy of

anaesthesia was monitored for the disappearance of pedal withdrawal reflex. After 6 or 48 h of reperfusion, animals were anaesthetized with isoflurane and euthanized by exsanguination. Sham-operated mice underwent the identical procedure without placement of the ligature.

2.3 Determination of the area at risk and myocardial infarct size

CD36^{+/+} and CD36^{-/-} mice were divided into two groups of 7 mice each, and assigned to vehicle or EP 80317 treatment. After 48 h of reperfusion, mice underwent anaesthesia, surgical preparation and a suture was tied at the previous ligation site. Evans blue 2% dye was injected in the aorta to delineate non-ischaemic tissue by the presence of blue staining¹² as detailed in Supplementary material online, Methods.

2.4 Myocardial function and haemodynamics

LV function indices were derived from the pressure-volume (PV) measurements using a miniaturized PV conductance catheter, as detailed in Supplementary material online, Methods. Briefly, CD36^{+/+} mice were divided into four groups of 8 mice each: two groups of sham-operated and MI/R mice (vehicle and EP 80317). After 6 or 48 h of reperfusion, a left thoracotomy was performed again, a microtip 1.4 Fr PV catheter (SPR 839, Millar Instruments) was inserted into the LV apex, connected to a transducer system (Millar) to generate PV loops according to Chua *et al.*¹³

2.5 Imaging experiments

High resolution imaging experiments were performed with the avalanche photodiode-based small animal μ PET scanner.¹⁴ Freshly prepared tracer analogues, including [¹⁸F]-FTHA (~37 MBq) and [¹⁸F]-FDG (~20 MBq), as well as the [¹¹C]-acetate (~20 MBq) tracer, were injected via the caudal vein in vehicle- and EP 80317-treated

CD36^{+/+} and CD36^{-/-} mice at 5.5 h following reperfusion and serial imaging was begun. List-mode dynamic acquisitions was initiated for 20 and 30 min after the injection of [¹¹C]-acetate, which was followed with [¹⁸F]-FTHA ($n = 8$ mice per group), according to Ménard *et al.*¹⁵ Similar experiments were performed with [¹⁸F]-FDG ($n = 14$ mice per group). Representative blood input and myocardium [¹⁸F]-FTHA and [¹⁸F]-FDG uptake curves (Supplementary material online, *Figure S1*) and detailed data analysis are provided in Supplementary material online, Methods.

2.6 Nonesterified fatty acid kinetics at steady-state

The albumin-[¹⁴C]-palmitate complex was prepared according to Oakes *et al.*¹⁶ and infused until steady-state at a dose of 7.4 KBq/kg/min in vehicle- and EP 80317-treated CD36^{+/+} and CD36^{-/-} mice ($n = 14$ mice per group), from 5 h after reperfusion. Four blood samples (50 μ L) were obtained at 10-min interval over the last 30 min and plasma palmitate kinetics was determined as detailed in Supplementary material online, Methods.

2.7 Biochemical assays

Blood from non-fasted mice was collected on 4 mM EDTA and plasma lipids and hormones were assayed using commercial kits as described in Supplementary material online, Methods.

2.8 Real-time PCR analysis

cDNA was prepared from total RNA extracted from epididymal fat using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). Real-time PCR was performed as in Supplementary material online, Methods using β -actin as an internal control.

2.9 Western blotting

Immunoblots of LV Akt, phosphoSer473-Akt (p-Akt), AMPK α 1/ α 2, phosphoThr172-AMPK (p-AMPK) (New England Biolabs) and mouse α -tubulin (Abcam) were performed as described in Supplementary material online, Methods. The signal was quantified by the ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics).

2.10 Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Comparisons between groups were performed on normally distributed data using unpaired t-test or one-way ANOVA followed by pairwise multiple comparisons using Bonferroni post-hoc test with GraphPad Prism4 Software. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Effect of EP 80317 treatment on MI/R injury and post-ischaeic LV function in CD36^{+/+} mice

Immediate post-operative mortality rate of the surgical procedure was 13% (24/226). MI/R was associated with a consistently large mean AAR of $65 \pm 2.4\%$ in vehicle-treated CD36^{+/+} mice which did not differ between groups, as shown on representative photomicrographs of LV cross-sections at mid-ventricular level (*Figure 1A*) and bar graph (*Figure 1B*). EP 80317 reduced infarct area (IA) by 34 and 31% ($P < 0.05$), as quantified by the IA to LV (*Figure 1C*) and IA to AAR weight ratios (*Figure 1D*), respectively. Treatment with EP 80317 did not modulate myocardial mRNA levels of insulin growth factor-1 (*Igf-1*) and insulin receptor substrate-1 (*Irs-1*) (data not shown). In additional experiments, a 14-day pretreatment with an equimolar dose of EP 51389, a synthetic GHRP tripeptide analogue that is

devoid of binding affinity to CD36,¹⁷ did not modulate AAR/LV mass (*Figure 1E*) nor infarcted area (*Figure 1F*) when compared to vehicle-treated mice, in contrast to EP 80317 which reduced IA/AAR by 39% ($P < 0.05$) (*Figure 1F*).

LV function was measured invasively in sham-operated and MI/R CD36^{+/+} mice pretreated with vehicle or EP 80317. A representative PV loop at steady state of vehicle-treated, sham-operated and MI/R mice is shown in Supplemental material online, *Figure S2*. Body weight and tibial length were similar in both sham-operated and MI/R groups (*Table 1*). Overall, early cardiac function declined in post-MI/R mice compared with sham-operated mice, as shown by a significant decline in maximal rate pressure rise (dP/dt_{max}) (38%) ($P < 0.05$), dP/dt_{min} (40%) ($P < 0.05$), ejection fraction (EF) (36%) ($P < 0.001$), stroke work (SW) (65%) ($P < 0.001$) and preload recruitable stroke work (PRSW) (39%) ($P < 0.05$), in vehicle-treated mice at 6 h post-MI/R. Heart rate (HR) fluctuated, but did not reach statistical differences among the groups. The load-dependent parameters of systolic function including stroke volume (SV), cardiac output (CO), EF and SW were improved after treatment with EP 80317. In particular, SW and EF were increased by 95 ($P < 0.05$) and 49% ($P < 0.01$) in EP 80317-treated-mice, respectively, while the load-independent parameter, PRSW, was not significantly different between EP 80317- and sham-operated mice. The relaxation time constant (τ) was prolonged by MI/R suggesting impaired LV relaxation, yet it was not significantly modulated by EP 80317. Arterial elastance (E_a) was elevated in post-MI/R mice, but declined to the level observed in sham-operated mice after treatment with EP 80317, suggesting an initial vascular response. In a similar manner, total peripheral resistance (TPR) was elevated post-MI/R mice, returning back to sham-operated levels in EP 80317-treated mice. Although the decline in cardiac function appeared to be moderate at 48 h post-MI/R, the effect of the treatment showed similar trends as those observed at 6 h (*Table 1*). Together, these results show that decreased cardiac contractility and increased vascular resistance following MI/R are largely improved by EP 80317 pretreatment.

3.2 Effect of EP 80317 treatment on myocardial energy substrate uptake, NEFA clearance and mobilization, and hormone levels following MI/R in CD36^{+/+} mice

Serial myocardial imaging of [¹⁸F]-FTHA, a marker of NEFA sarcolemmal and mitochondrial uptake in the myocardium,¹⁸ was used to estimate plasma NEFA fractional extraction and myocardial uptake rates following reperfusion of ischaemic hearts, according to the protocol outlined in *Figure 2A*. Whereas plasma NEFA fractional extraction was unaffected by EP 80317 treatment (*Figure 2B*), myocardial [¹⁸F]-FTHA uptake was reduced by 43% ($P < 0.01$) (*Figure 2C*). Imaging of [¹⁸F]-FDG revealed unaltered plasma fractional extraction (*Figure 2D*) and myocardial metabolic rate of glucose (MMRG) (*Figure 2E*) in EP 80317-treated CD36^{+/+} mice. In addition, CD36^{+/+} mice, treated or not with EP 80317, had similar myocardial blood flow index (*Figure 2F*) and oxidative metabolism (O₂ uptake) (*Figure 2G*) as assessed using [¹¹C]-acetate compartmental kinetic analysis.¹⁹ Plasma NEFA were reduced by 33% ($P < 0.001$ vs. vehicle) in CD36^{+/+} mice treated with EP 80317, returning to baseline levels by 48 h (*Figure 2H*). No significant effect of EP 80317 was observed on glycaemia (*Figure 2I*), insulin plasma levels (*Figure 2J*), catecholamines (*Figure 2K*) and triglycerides (results not shown). LV function was also assessed by μ PET ventriculography at 6 h post-MI/R. SV was increased by 33% ($P < 0.01$) in EP 80317-treated mice vs. vehicle (*Figure 2L*). In addition, neither HR (*Figure 2M*) nor mean arterial blood pressure (MABP) (*Figure 2N*) were changed by the treatment.

The systemic clearance of [¹⁴C]-palmitate was assessed at steady state following infusion of the tracer. EP 80317 did not change [¹⁴C]-palmitate plasma clearance (*Figure 3A*), yet the appearance rate of NEFA in circulation was reduced by 19% ($P < 0.05$) (*Figure 3B*). The potential role of adipose tissue in regulating circulating NEFA levels was investigated by determining the level of expression of selected adipogenic

and anti-lipolytic genes. Epididymal fat from EP 80317-treated CD36^{+/+} mice showed a 1.5-, 1.8-, 1.5- and 1.5-fold increase ($P < 0.05$) of CCAAT-enhancer-binding protein alpha (Cebp α) (Figure 3C), cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase encoding gene 1 (Pck1) (Figure 3D), perilipin 1 (Plin1) (Figure 3E) and diacylglycerol acyltransferase 2 (Dgat2) (Figure 3F) mRNA levels, respectively, but no change in uncoupling protein 1 (Ucp1) was observed (data not shown). Changes in epididymal mRNA levels of the selected genes were transient inasmuch as no change was observed at 48 h following reperfusion of treated animals (Figure 3C-F).

3.3 Effect of EP 80317 treatment on myocardial AMPK and Akt phosphorylation after MI/R in CD36^{+/+} mice

Western blots analysis of myocardial protein homogenates showed that the relative ratio of pThr172-AMPK to total AMPK band density was increased, by 121% ($P < 0.01$) (Figure 4A and B) at 6 h after reperfusion of ischaemic hearts in EP 80317-treated CD36^{+/+} mice. In a similar manner, the ratio of pSer473-Akt to total Akt was increased by 57% ($P < 0.05$) (Figure 4A and C). Whereas AMPK phosphorylation ratio was unchanged compared to that of vehicle-treated mice at 48 h post-reperfusion, Akt phosphorylation ratio was still elevated by 89% ($P < 0.01$ vs. vehicle) (Figure 4A-C).

3.4 Effect of EP 80317 treatment after transient myocardial ischaemia in CD36^{-/-} mice

In CD36^{-/-} mice, AAR to total LV area did not differ between groups, as shown on representative photomicrographs of LV cross-sections at midventricular level (Figure 5A) and bar graph (Figure 5B). EP 80317 had no cardioprotective effect on myocardial injury (Figure 5C and D). In a similar manner, μ PET data analysis did not reveal change in NEFA or glucose myocardial uptake (Figure 5E-H), or

myocardial perfusion and oxidative metabolism after 6 h of reperfusion (*Figure 5I and J*). In addition, neither [¹⁴C]-palmitate plasma clearance (*Figure 5K*), nor NEFA appearance rate (*Figure 5L*), as well as NEFA, glycaemia, insulin or catecholamine plasma levels (*Figure 5M-P*) were modulated by a pretreatment with EP 80317 in CD36^{-/-} mice.

4. Discussion

The major finding of the present study was that pretreatment with EP 80317, a synthetic hexapeptide ligand of the CD36 receptor, exerts cardioprotective effects that are associated with transient reduction of circulating NEFA levels and myocardial uptake following transient MI/R in mice. Interestingly, daily administration of EP 80317 did not modulate plasma NEFA levels in sham-operated mice (results not shown), which may suggest selective cardioprotective effect of the peptide in the context of MI/R. Indeed, CD36 is a multiligand receptor involved in multiple functions, including facilitation of a large fraction of cellular long chain fatty acids entry in the heart, skeletal muscle and adipocyte which feature scavenging function for specific bacterial and fungal components, apoptotic cells and oxidatively modified low density lipoproteins.²⁰

In the present study, myocardial infarction was elicited secondary to the temporary occlusion of the LAD coronary artery in mice, generating reproducible AAR and infarct size at 48 h post-reperfusion in agreement with values previously reported.²¹ Reduced myocardial damage after pretreatment with EP 80317 was found to be IGF-1-independent (data not shown). In line with a role for CD36 in mediating these cardioprotective effects, neither myocardial injury, nor any of the metabolic or hormonal parameters were modulated by treatment with EP 80317 in CD36^{-/-} mice (*Figure 5*). Furthermore, the administration of an equimolar dose of the GHRP tripeptide analogue, EP 51389, which featured no binding affinity to CD36,¹⁷ did not

reduce myocardial injury (*Figure 1E and F*), as previously shown in hypophysectomized rats.⁶

Cardiovascular function derived from PV loops indicated deterioration of LV function at 6 h after reperfusion of ischaemic hearts in mice treated with vehicle, as shown by a marked decline in SV and CO, increased Ea, elevated vascular resistance and a prolonged tau, indicating impaired LV relaxation (*Table 1*). No significant change in HR was observed. This is in agreement with impaired contractile recovery following reperfusion of ischaemic heart associated with high rates of long chain fatty acid uptake and oxidation.²² Indeed, increased NEFA availability as a consequence of peripheral lipolysis²³ may lead to myocardial accumulation of long-chain acyl-CoA esters and increased levels of free oxygen radicals.²⁴ Along this line of events, myocardial NEFA oxidation is associated with increased oxygen consumption and reduced glucose oxidation, accumulation of lactate and intracellular acidification, thereby shifting away ATP from contractile function in order to maintain ionic homeostasis.²⁵ The decline in the load-dependent contractility indexes including EF and SW as well as that of the load-independent parameter PRSW, were markedly improved in mice treated with EP 80317 at 6 h post-MI/R (*Table 1*), in line with results obtained by μ PET ventriculography (*Figure 2L*). In addition, an increase in dP/dt_{max} was observed at 48 h (*Table 1*), paralleling with reduced infarct size. Interestingly, previous studies showed that a 14-day treatment with hexarelin, initiated one month after eliciting myocardial infarction in rats, was associated with similar haemodynamic effects including increased SV and reduced TPR.⁷ Yet, additional studies will be necessary to assess the effect of the treatment on post-ischaemic contractile recovery.

An important observation of the present study is the reduced myocardial NEFA uptake as determined by μ PET imaging of [¹⁸F]-FTHA (*Figure 2*). Yet, neither

fractional plasma extraction rate of NEFA, nor myocardial *Cd36* mRNA expression levels (results not shown), were altered following treatment with EP 80317, suggesting that reduced circulating levels of NEFA in treated mice largely accounted for the reduced NEFA myocardial uptake. With regards to [^{18}F]-FTHA uptake, it is possible that a larger infarcted area in vehicle-treated mice led to lower fractional uptake rates with underestimation of total NEFA uptake. This limitation would have reduced our capacity to detect the demonstrated reduction in cardiac NEFA uptake with EP 80317 treatment as the latter displayed reduced infarcted area. Additional μPET imaging studies showed that neither the fractional plasma extraction rate of [^{18}F]-FDG, nor the estimated MMRG were modulated in EP 80317-treated mice compared to the vehicle group. Myocardial glucose and NEFA oxidation rates have been assessed through the use of tracer analogues. Yet, the fact that more than 90% of ^{18}F activity is found in mitochondria after intravenous injection of [^{18}F]-FTHA suggests that myocardial [^{18}F]-FTHA uptake is a good marker of myocardial NEFA oxidation.¹⁸ Notwithstanding potential limitation in extrapolating FDG data modeling to myocardial glucose metabolism,²⁶ no effect of the treatment on glucose uptake and oxidation could be detected in the present study. Interestingly, neither myocardial perfusion nor myocardial oxidative metabolism, as determined by [^{11}C]-acetate μPET imaging, was significantly modulated by EP 80317 (*Figure 2F and G*), despite reduced myocardial fatty acid uptake and no apparent change in MMRG. A possible explanation for this observation may be a compensatory increase in the utilization of alternative sources of energy for oxidative metabolism. In this regard, blood lactate levels were decreased in EP 80317-treated mice in the first min following reperfusion of ischaemic hearts, suggesting reduced myocardial lactate accumulation in these mice (data not shown).

Taking into account the lack of apparent change in plasma insulin and catecholamine levels (*Figure 2J and K*) and that NEFA appearance rate was reduced (*Figure 3*), the role of adipose tissue in regulating circulating fatty acid levels was shown by the

relative increase in mRNA levels of *Cebpa*, *Plin1*, *Pck1* and *Dgat2* in epididymal fat tissues of EP 80317-treated CD36^{+/+} mice at 6 h after reperfusion. No change was observed for *Ucp1* (data not shown). These findings support a transient attenuation in adipose tissue fatty acid mobilization and an increase of triacylglycerol storage.^{27,28}

Metabolic stresses such as MI/R are known to rapidly activate AMPK in cardiomyocytes to enhance pathways conducive to ATP generation, targeting key enzymes of the glycolytic and fatty acid oxidation pathways²⁹ in a manner to preserve ATP for the contractile activity of the heart.³⁰ Both GLUT4 and CD36 trafficking to plasma membrane are regulated by AMPK; while AMPK activation appears to be cardioprotective in MI/R,³¹ caution has been raised regarding its prolonged activation at times of heart exposure to high levels of circulating NEFA, with the potential for fatty acid oxidation burst.³² Our results show a transient 121% increase in phospho-AMPK at 6 h, whereas phospho-Akt was still elevated by 89% at 48 h following reperfusion in EP 80317-treated CD36^{+/+} mice. The latter has been reported to be rapidly phosphorylated and activated following reperfusion³³ and to exert cardioprotective effect through the recruitment of anti-apoptotic pathways,³⁴ activation of glycogen synthesis,³⁵ inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening,³⁶ endothelial nitric oxide synthase and protein kinase C activation.³⁷ In addition, Akt activation may exert metabolic effects, including sarcolemmal translocation of GLUT4 vesicles³⁸ and enhance glycolysis to glucose oxidation coupling.³⁹ Altogether, these observations support a favorable coupling between glycolytic products and their oxidation in the context of a reduced lipid burden during the early phase of myocardial reperfusion.^{40,41}

In conclusion, our results show a cardioprotective effect of EP 80317, a selective ligand of CD36. The treatment was associated with beneficial myocardial and peripheral transient metabolic changes in the first hours following reperfusion of

ischaemic hearts. The cardioprotective effects of the peptide in MI/R, coupled to its potent anti-atherosclerotic activity,⁹ support the clinical potential of CD36 ligands in the treatment of ischaemic heart disease.

Supplementary material

Supplementary material is available at Cardiovascular Research online.

Funding

This work was supported by a grant from Heart and Stroke Foundation of Quebec and the Canadian Institute of Health Research [CIHR - MOP 97915]. V.L.B., S.M.L, and D.N.H are recipients of the fond de recherche en santé du Québec (FRSQ), Canadian Diabetes Association and Groupe de recherche universitaire sur le médicament studentships, respectively. A.C.C. is a recipient of a FRSQ Senior Scholarship Award.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Jean-François Tanguay for critical reading of the manuscript and Petra Pohankova and Marc-Antoine Gillis for their skillful technical assistance.

Conflict of Interest: none declared.

References

1. Chabowski A, Gorski J, Glatz JF, Luiken JJP, Bonen A. Protein-mediated fatty acid uptake in the heart. *Curr Cardiol Rev* 2008;4:12-21.
2. Smith J, Su X, El-Maghrabi R, Stahl PD, Abumrad NA. Opposite regulation of CD36 ubiquitination by fatty acids and insulin: effects on fatty acid uptake. *J Biol Chem* 2008;283:13578-13585.
3. Koonen DP, Febbraio M, Bonnet S, Nagendran J, Young ME, Michelakis ED *et al.* CD36 expression contributes to age-induced cardiomyopathy in mice. *Circulation* 2007;116:2139-2147.
4. Yang J, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Kovacs A *et al.* CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res* 2007;100:1208-1217.
5. De Gennaro Colonna V, Rossoni G, Bernareggi M, Müller EE, Berti F. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol* 1997;334:201-207.
6. Locatelli V, Rossoni G, Schweiger F, Torsello A, De Gennaro Colonna V, Bernareggi M *et al.* Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* 1999;140:4024-4031.
7. Tivesten A, Bollano E, Caidahl K, Kujacic V, Sun XY, Hedner T *et al.* The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* 2000;141:60-66.
8. Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A *et al.* CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res* 2002;90:844-849.

9. Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang Y *et al.* EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J* 2005;19:1869-1871.
10. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng WL, Pearce SFA *et al.* A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:19055-19062.
11. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, Nie Q, Kong S, Izumo S. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004;16:349-360.
12. Bohl S, Medway DJ, Schulz-Menger J, Schneider JE, Neubauer S, Lygate CA. Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H2054-H2058.
13. Chua CC, Gao J, Ho YS, Xu X, Kuo IC, Chua KY *et al.* Over-expression of a modified bifunctional apoptosis regulator protects against cardiac injury and doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2009;81:20-27.
14. Lecomte R, Cadorette J, Rodrigue S, Lapointe D, Rouleau D, Bentourkia M *et al.* Initial results from the Sherbrooke avalanche photodiode positron tomograph. *IEEE Trans Nucl Sci* 1996;43:1952-1957.
15. Menard SL, Croteau E, Sarrhini O, Gelinas R, Brassard P, Ouellet R *et al.* Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E1049-E1057.
16. Oakes ND, Thalen PG, Jacinto SM, Ljung B. Thiazolidinediones increase plasma-adipose tissue FFA exchange capacity and enhance insulin-mediated control of systemic FFA availability. *Diabetes* 2001;50:1158-1165.

17. Harb D, Bujold K, Febbraio M, Sirois MG, Ong H, Marleau S. The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 2009;83:42-51.
18. Ci X, Frisch F, Lavoie F, Germain P, Lecomte R, van Lier JE *et al.* The effect of insulin on the intracellular distribution of 14(R,S)-[18F]Fluoro-6-thia-heptadecanoic acid in rats. *Mol Imaging Biol* 2006;8:237-244.
19. Sorensen J, Valind S, Andersson LG. Simultaneous quantification of myocardial perfusion, oxidative metabolism, cardiac efficiency and pump function at rest and during supine bicycle exercise using 1-11C-acetate PET--a pilot study. *Clin Physiol Funct Imaging* 2010;30:279-284.
20. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* 2009;2:re3.
21. Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M *et al.* Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* 2001;89:168-173.
22. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005;85:1093-1129.
23. Hendrickson SC, St Louis JD, Lowe JE, Abdel-Aleem S. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1997;166:85-94.
24. Lazar HL. Alterations in myocardial metabolism in the diabetic myocardium. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2006;18:289-292.
25. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 2010;90:207-258.

26. Barr RL, Lopaschuk GD. Methodology for measuring in vitro/ex vivo cardiac energy metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;43:141-152.
27. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr* 2007;27:79-101.
28. Franckhauser S, Munoz S, Pujol A, Casellas A, Riu E, Otaegui P *et al.* Increased fatty acid re-esterification by PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:624-630.
29. Schwenk RW, Dirkx E, Coumans WA, Bonen A, Klip A, Glatz JF *et al.* Requirement for distinct vesicle-associated membrane proteins in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced translocation of GLUT4 and CD36 in cultured cardiomyocytes. *Diabetologia* 2010;53:2209-2219.
30. Jessen N, Koh HJ, Folmes CD, Wagg C, Fujii N, Lofgren B *et al.* Ablation of LKB1 in the heart leads to energy deprivation and impaired cardiac function. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802:593-600.
31. Russell III RR, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M *et al.* AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* 2004;114:495-503.
32. Hopkins TA, Dyck JRB, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem Soc Trans* 2003;31:207-212.
33. Crozier SJ, Zhang X, Wang J, Cheung J, Kimball SR, Jefferson LS. Activation of signaling pathways and regulatory mechanisms of mRNA translation following myocardial ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 2006;101:576-582.

34. Liem DA, Honda HM, Zhang J, Woo D, Ping P. Past and present course of cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. *J Appl Physiol* 2007;103:2129-2136.
35. Taegtmeier H. Glycogen in the heart--an expanded view. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:7-10.
36. Davidson SM, Hausenloy D, Duchen MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:414-419.
37. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 2004;61:448-460.
38. Horie T, Ono K, Nagao K, Nishi H, Kinoshita M, Kawamura T *et al.* Oxidative stress induces GLUT4 translocation by activation of PI3-K/Akt and dual AMPK kinase in cardiac myocytes. *J Cell Physiol* 2008;215:733-742.
39. Soltys CL, Kovacic S, Dyck JR. Activation of cardiac AMP-activated protein kinase by LKB1 expression or chemical hypoxia is blunted by increased Akt activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2472-H2479.
40. Oliver MF. Antilipolytic drugs for the prevention of primary ventricular fibrillation. *Diabetes Obes Metab* 2001;3:61-65.
41. Venturini A, Ascione R, Lin H, Polesel E, Angelini GD, Suleiman MS. The importance of myocardial amino acids during ischemia and reperfusion in dilated left ventricle of patients with degenerative mitral valve disease. *Mol Cell Biochem* 2009;330:63-70.

Legends to figures

Figure 1 EP 80317 reduces infarcted areas following MI/R. Representative photomicrographs of (A) midventricular myocardium showing the infarct area (IA) on the anterior section and bar graphs of (B) area-at-risk (AAR)/LV, (C) IA/LV and (D) IA/AAR. EP 51389, a GHRP analogue devoid of affinity to CD36 did not modulate (E) AAR/LV and (F) IA/AAR, in contrast to EP 80317. Data are mean \pm SEM of $n = 5-6$ mice. $*P < 0.05$ vs. vehicle. Scale bar, 1 mm.

Figure 2 EP 80317 reduces circulating NEFA and myocardial NEFA uptake and the decline in stroke volume (SV) as assessed by μ PET and ventriculography. (A) Schematic representation of the experimental protocol involving sequential administration of radiotracers in mice pretreated with EP 80317 or vehicle. Bar graphs of (B) NEFA fractional extraction, (C) myocardial NEFA uptake, (D) glucose fractional extraction, (E) myocardial metabolic rate of glucose (MMRG), (F) myocardial blood flow, (G) myocardial oxidative metabolism, (H) plasma NEFA, (I) glycaemia, (J) plasma insulin, (K) plasma catecholamines, (L) SV, (M) heart rate (HR), (N) mean arterial blood pressure (MABP). Data are mean \pm SEM of $n = 6-8$ mice for [18 F]-FTHA and [11 C]-acetate μ PET, [18 F]-FDG ventriculography and plasma hormones and $n = 12-14$ mice for [18 F]-FDG μ PET. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ vs. vehicle and $####P < 0.001$ vs. EP 80317.

Figure 3 EP 80317 reduces NEFA apparition rate following MI/R. Bar graphs of (A) [14 C]-palmitate plasma clearance, (B) NEFA apparition rate and mRNA levels of adipocyte genes (C) *Cebpa*, (D) *Pck1*, (E) *Plin1* and (F) *Dgat2*. Statistical analysis of *Cebpa* and *Plin1* were performed on log-transformed data. Data are mean \pm SEM of $n = 6-8$ mice (mRNA) and 12-13 mice ([14 C]-palmitate). $*P < 0.05$ vs. vehicle.

Figure 4 EP 80317 increases AMPK and Akt phosphorylation following MI/R. (A) Western blots of band densities of pThr172-AMPK and AMPK or pSer473-Akt and Akt at 6 or 48 h after MI/R. Bar graphs represent the relative band intensity ratios that have been normalized to α -tubulin band intensity. Data are mean \pm SEM of 5 mice per group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. vehicle.

Figure 5 EP 80317 does not reduce myocardial injury or modulate myocardial substrate uptake in CD36^{-/-} mice. Representative photomicrographs of (A) midventricular myocardium showing the IA on the anterior section and bar graphs of (B) AAR/LV, (C) IA/LV and (D) IA/AAR. (E) NEFA fractional extraction, (F) myocardial NEFA uptake, (G) glucose fractional extraction, (H) myocardial metabolic rate of glucose, (I) myocardial blood flow index (J) and myocardial oxidative metabolism index. (K) [¹⁴C]-palmitate plasma clearance, (L) NEFA apparition rate, (M) plasma NEFA, (N) glycaemia, (O) plasma insulin and (P) plasma catecholamines. Data are mean \pm SEM. $n = 5-7$ mice (infarct, [¹⁸F]-FTHA, [¹¹C]-acetate, [¹⁴C]-palmitate and plasma hormones) and 12-13 mice ([¹⁸F]-FDG). *** $P < 0.001$ vs. vehicle and #### $P < 0.001$ vs. EP 80317. Scale bar, 1 mm.

Table 1 Left ventricular function of sham-operated and MI/R mice 6 or 48 h post-ischaemia

	6 h				48 h			
	Sham		I/R		Sham		I/R	
	0.9% NaCl	EP 80317	0.9% NaCl	EP 80317	0.9% NaCl	EP 80317	0.9% NaCl	EP 80317
<i>n</i>	7	7	8	7	6	6	6	7
Body weight, g	30±1	29±1	29±1	29±1	29±1	28±1	28±1	30±1
Tibial length, mm	18±0	18±0	18±0	18±0	18±0	18±0	17±0	18±0
HR, b.p.m.	406±15	420±25	369±19	374±19	462±13	426±17	405±18	435±12
SV, µL	16±1	18±1	8±1***,###	13±1**,##,λλ	15±1	15±1	10±1**,##	16±1 ^{λλλ}

CO, mL/min	7±0	7±1	3±0***.###	5±0*.##.λ	7±0	6±0	4±1***.#	7±0 ^{λλ}
EF, %	71±5	66±3	46±2***.##	68±5 ^{λλ}	80±4	76±2	73±6	74±4
Ea, mmHg/μL	5.3±0.6	4.7±0.4	9.4±1.2**.*###	5.9±0.3 ^λ	5.4±0.5	5.9±0.3	8.4±1.3*	5.7±0.4
TPR, mmHg min/mL	13±1	11±1	26±4**.*##	16±1	12±1	14±1	21±3**	14±1 ^λ
Systolic								
Pes, mmHg	89±16	85±5	75±4	78±4	89±4	90±5	85±3	95±3
Ves, μL	7±1	9±1	9±1	7±2	4±1	5±0	4±1	6±1
dP/dt max, mmHg/s	6745±613	6607±817	4212±334*.*#	4889±463	6833±253	6797±686	6030±459	7782±275
SW, mmHg μL	1180±109	1158±111	409±45***.*###	799±84*.*λ	1070±85	1066±91	732±101	1147±81 ^λ
PRSW, mmHg	90±12	78±11	55±7*	75±12	95±9	75±11	76±6	87±6

Diastolic

Ped, mmHg	2±0	2±1	3±1	3±1	2±1	2±0	2±0	3±1
Ved, μL	24±2	27±2	16±2	20±3	20±2	20±0	14±1	22±2
dP/dt min, mmHg/s	-5501±571	-5649±746	-3276±405*. [#]	-3852±449	-6069±396	-6245±587	-5385±384	-6646±367
τ, ms	12.4±0.8	12.1±1.5	24.1±3.8**. ^{###}	21.4±3.2*. [#]	10.7±1.0	10.9±0.8	12.6±1.0	10.8±0.6

In vivo cardiac function was measured by the Millar conductance catheter system; HR, heart rate; SV, stroke volume; CO, cardiac output; EF, ejection fraction; Ea, arterial elastance; TPR, total peripheral resistance (Pes/CO); Pes, end-systolic pressure; Ves, end-systolic volume; dP/dt_{max} (or min), maximal rate of pressure increase (or decline); SW, stroke work; PRSW, preload recruitable stroke work; Ped, end-diastolic pressure; Ved, end diastolic volume; τ, relaxation time constant. Data are mean±SEM. **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001 vs. vehicle-treated sham mice, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01 and ^{###}*P*<0.001 vs. EP 80317-treated sham mice, ^λ*P*<0.05, ^{λλ}*P*<0.01 and ^{λλλ}*P*<0.001 vs. vehicle-treated MIR mice.

Figure 1.

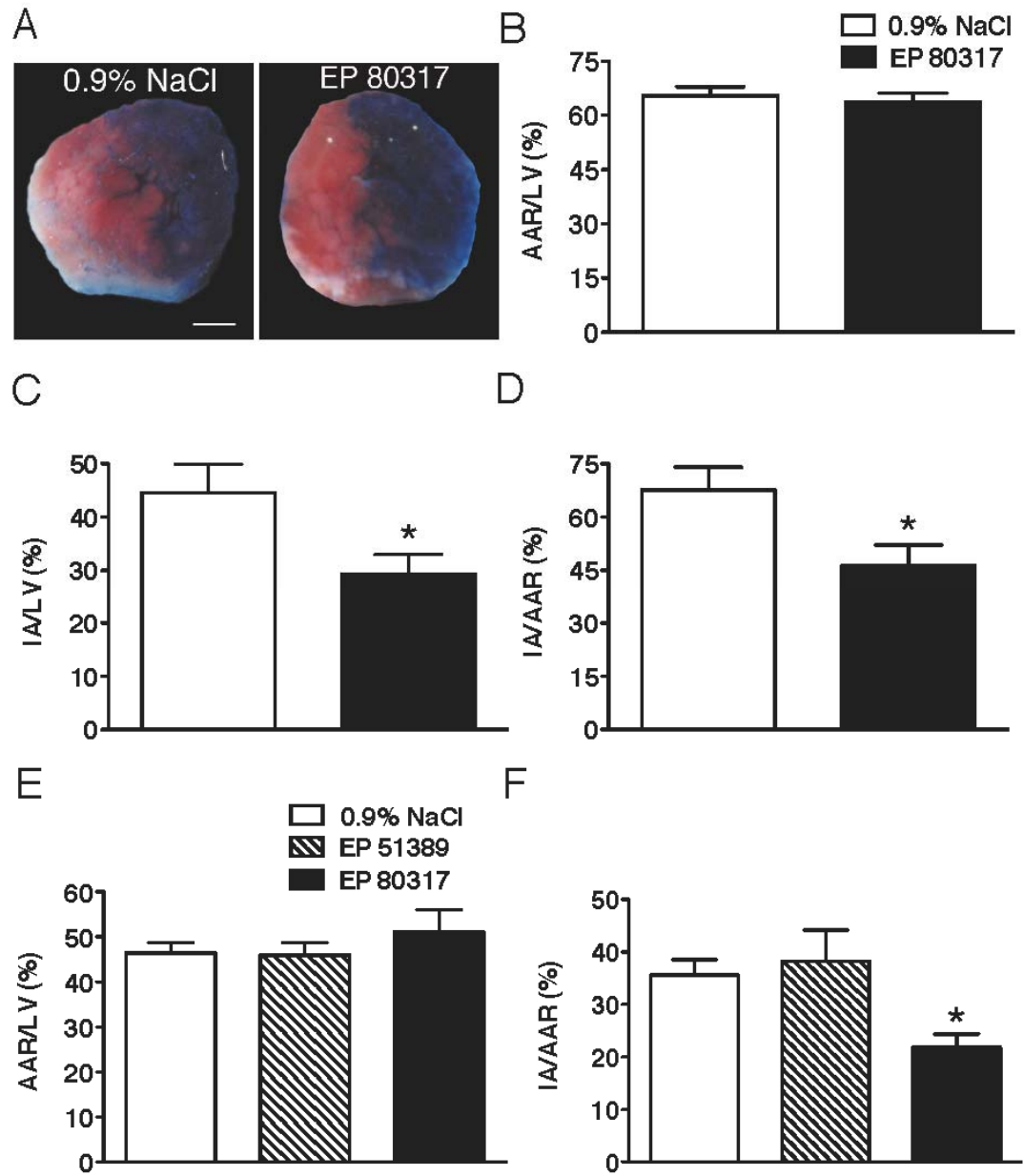


Figure 2.

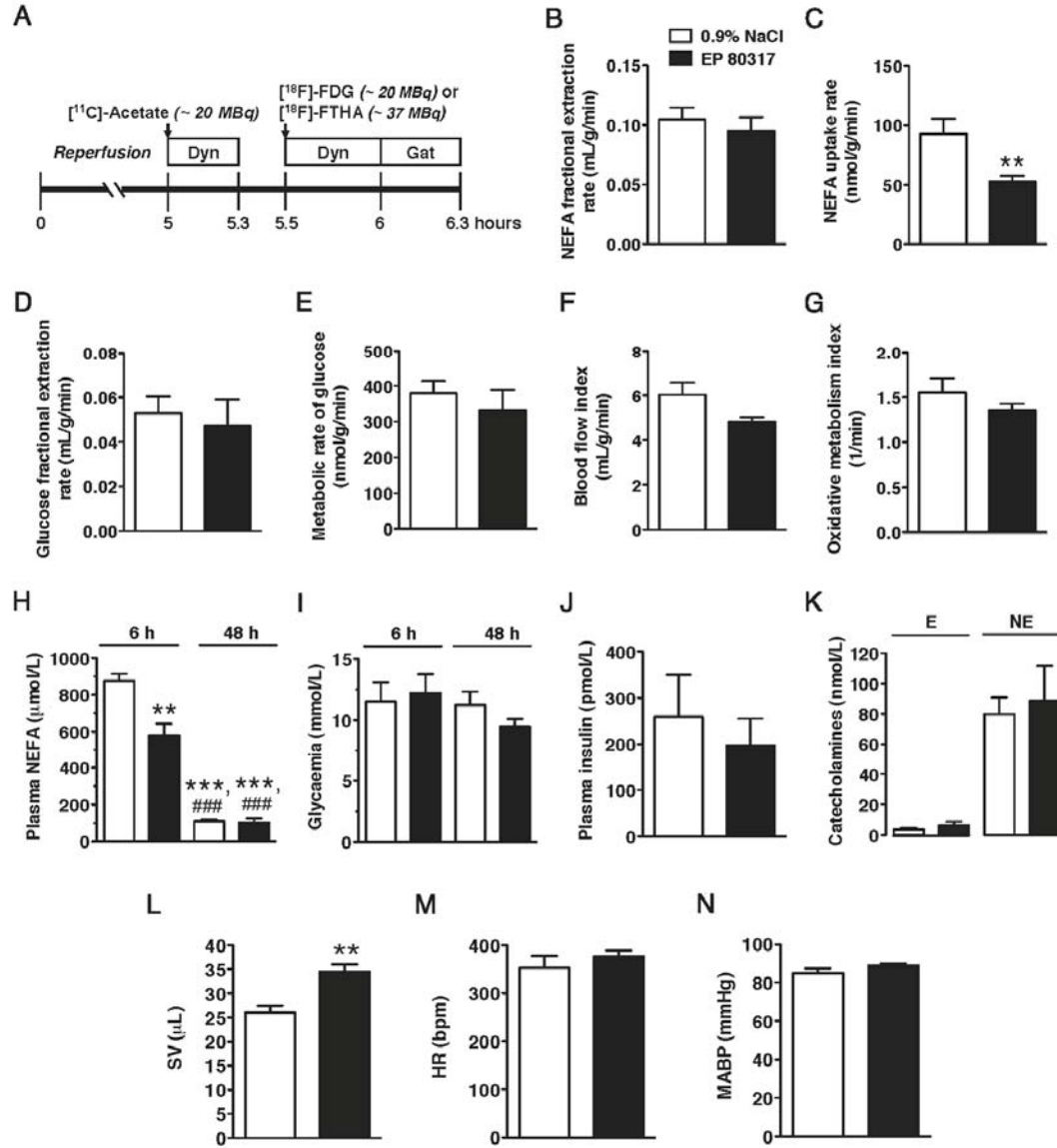


Figure 3.

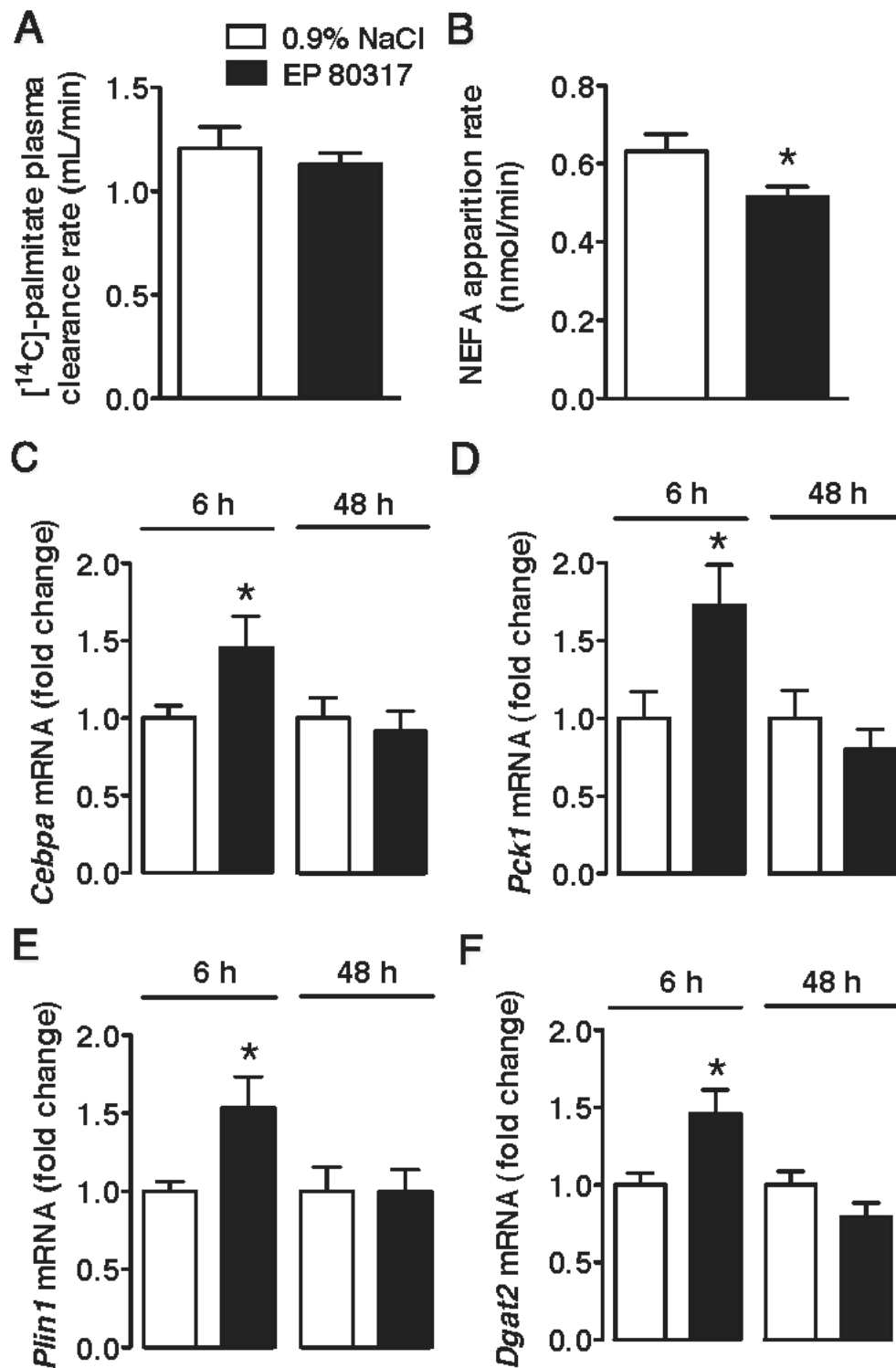
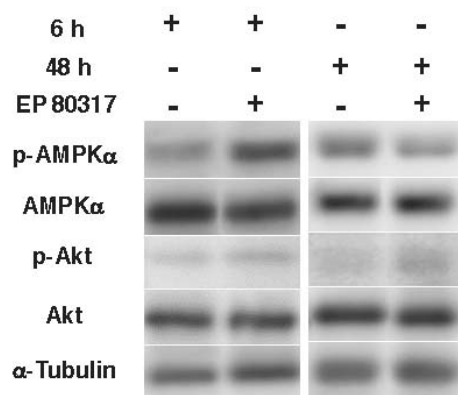
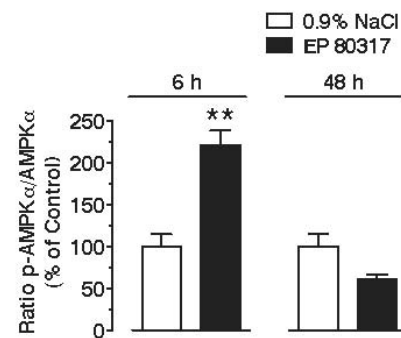


Figure 4.

A



B



C

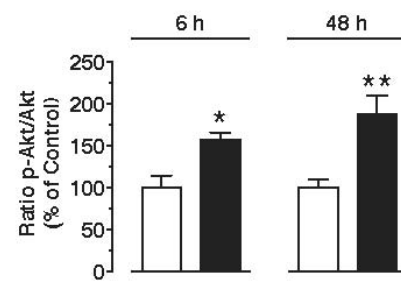


Figure 5.

